

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAYSA BERVIAN BASSANI

**ESTUDO DOS EFEITOS DA CURCUMINA NO MODELO DE DOENÇA DE
ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDO POR INJEÇÃO
INTRACEREBROVENTRICULAR DE ESTREPTOZOTOCINA EM RATOS**

CURITIBA

2017

TAYSA BERVIAN BASSANI

**ESTUDO DOS EFEITOS DA CURCUMINA NO MODELO DE DOENÇA DE
ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDO POR INJEÇÃO
INTRACEREBROVENTRICULAR DE ESTREPTOZOTOCINA EM RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital.

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Bassani, Taysa Bervian

Estudo dos efeitos da curcumina no modelo de doença de Alzheimer esporádica induzido por injeção intracerebroventricular de estreptozotocina em ratos./ Taysa Bervian Bassani. – Curitiba, 2017.

101 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Maria Aparecida Barbato Frazão Vital

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Alzheimer, Doença de. 2. Curcumina. 3. Memória. 4. Estreptozocina 5. Neurogênese I. Título II. Vital, Maria Aparecida Barbato Frazão, 1964- III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 616.831



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **TAYSA BERVIAN BASSANI** intitulada: **ESTUDO DOS EFEITOS DA CURCUMINA NO MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDO POR INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE ESTREPTOZOTOCINA EM RATOS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 18 de Agosto de 2017.

MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ELAINE APARECIDA DEL BEL BELLUZ GUIMARAES

Avaliador Externo (USP/RP)

ROBERTO ANDREATINI

Avaliador Interno (UFPR)

BRUNO JACKSON MARTYNHAK

Avaliador Externo (UFPR)

CRISTINA APARECIDA JARK STERN

Avaliador Externo (UFSC)

*Aos meus pais Elaine e Antonio, ao meu irmão Eduardo, à minha avó Willita e
ao meu namorado Douglas por todo o apoio, incentivo, amor incondicional e
por tudo o que representam na minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais Elaine e Antonio, ao meu irmão Eduardo, à minha avó Willita e a toda a minha família pelo amor incondicional, apoio, carinho, orações, paciência, incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu namorado Douglas por todo carinho, amor, amizade, apoio, incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

À Professora Maria Vital pela oportunidade que me deu, pela orientação ao longo de seis anos, pelos ensinamentos, pela amizade, pela paciência, pela motivação e incentivo em muitos momentos.

Aos membros da banca pela leitura, sugestões e contribuições.

Aos meus amigos e colegas do grupo da Professora Maria e de toda a Farmacologia, especialmente Jeane, Eric, Meira e Joelle, pela ajuda nos experimentos, pelos ensinamentos, pela amizade, pelas festas, conversas e risadas e por tornarem a jornada mais suave.

Aos meus amigos da vida toda por tornarem tudo mais fácil.

À Jéssica Bonato e à Professora Rúbia Weffort de Oliveira do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da UEM, ao Valentín Cópola Segovia e ao Professor Silvio Zanata do Departamento de Patologia da UFPR pelos ensinamentos, pela ajuda nos experimentos, por cederem os seus laboratórios e reagentes, pela amizade e apoio.

Às Professoras Janaina Zanoveli e Joice da Cunha pelo gentil empréstimo da estreptozotocina para iniciarmos o estudo do modelo animal.

A todos os Professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da UFPR pelos ensinamentos, ajuda, assistência e apoio.

À UFPR por ter sido a minha segunda casa por 11 anos da minha vida e por toda a minha formação e crescimento profissional e pessoal.

A todos os animais usados nos experimentos.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Alterações precoces no metabolismo cerebral da glicose e nas vias de sinalização da insulina podem participar da patogênese da forma esporádica da doença de Alzheimer (DA). Injeções intracerebroventriculares (ICV) de estreptozotocina (STZ) são usadas para mimetizar essas alterações em roedores. A STZ causa prejuízos na sinalização cerebral da insulina, estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunções na neurogênese, os quais resultam em declínio cognitivo e são características da DA esporádica. O objetivo da primeira parte do presente trabalho foi avaliar em conjunto a pouco estudada influência da injeção ICV de STZ (3 mg/kg) sobre a neuroinflamação, a neurogênese adulta e os consequentes déficits cognitivos em ratos Wistar. A STZ causou uma resposta inflamatória aguda e crônica, representada por astrogliose (GFAP) e microgliose (Iba-1) reativas, nas áreas peri-ventriculares e no hipocampo dorsal. Isto foi acompanhado por redução da proliferação celular (Ki-67) no giro denteado (GD) do hipocampo e na zona subventricular (ZSV). Verificou-se também uma diminuição no número de neurônios imaturos (Doublecortin - DCX) e na sobrevivência, diferenciação e maturação dos novos neurônios (BrdU/NeuN). Isto resultou em prejuízos na memória espacial de curto prazo no teste de localização de objetos (TLO) e no labirinto em Y, além de prejuízos na memória espacial de longo prazo no condicionamento de medo ao contexto. Esses resultados apoiam relatos prévios de um efeito negativo da neuroinflamação sobre a neurogênese adulta. Na segunda parte do presente trabalho foram avaliados os efeitos da curcumina no modelo induzido por STZ-ICV. A curcumina é um composto polifenólico natural com evidências de propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras. Evidências recentes também sugerem que a curcumina melhora o desempenho cognitivo em modelos animais de demência e este efeito estaria relacionado à sua capacidade de estimular a neurogênese adulta. Dessa forma, o objetivo da segunda parte do trabalho foi testar a hipótese de que o tratamento oral prolongado com curcumina seria capaz de preservar as funções cognitivas pelo aumento da neurogênese adulta e inibição da neuroinflamação no modelo de DA esporádica induzido por STZ-ICV. Os animais foram injetados com STZ-ICV ou veículo e o tratamento com curcumina (25, 50 e 100 mg/kg, gavagem) foi realizado por 30 dias, iniciando 1 h antes da cirurgia. Após quatro semanas, os animais do grupo STZ exibiram prejuízos na memória espacial (TLO e labirinto em Y) e de reconhecimento de curto prazo (TRO), diminuição da proliferação celular (Ki-67) e de neurônios imaturos (DCX) na ZSV e no GD, além de aumento dos marcadores gliais GFAP e Iba-1. O tratamento com curcumina (50 e 100 mg/kg) preveniu os prejuízos na memória de reconhecimento no TRO, mas não na memória espacial no TLO e labirinto em Y. Todas as doses de curcumina testadas exerceram uma melhora limitada na neuroinflamação (reatividade glial), resultando em ausência de efeitos significativos sobre a neurogênese hipocampal e subventricular. Esses resultados sugerem um efeito positivo da curcumina na memória de reconhecimento de objetos de curto prazo que não está relacionado a uma melhora na neurogênese adulta.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Curcumina. Neurogênese adulta. Neuroinflamação. Memória. Estreptozotocina.

ABSTRACT

Early impairments in cerebral glucose metabolism and insulin signaling pathways may participate in the pathogenesis of the sporadic form of Alzheimer's disease (sAD). Intracerebroventricular (ICV) injections of low doses of streptozotocin (STZ) are used to mimic sAD these alterations in rodents. STZ causes impairments in insulin signaling and has been reported to trigger several alterations in the brain, such as oxidative stress, neuroinflammation, and dysfunctions in adult neurogenesis, which may be involved in cognitive decline and are features of human AD. The aim of the first part of the present study was to assess the poorly characterized influence of ICV injection of STZ (3 mg/kg) on neuroinflammation, adult neurogenesis and the consequent cognitive deficits in Wistar rats. STZ caused an acute and chronic neuroinflammatory response, reflected by reactive microgliosis (Iba-1) and astrogliosis (GFAP) in periventricular areas and the dorsal hippocampus, accompanied by a marked reduction of the cellular proliferation (Ki-67) in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus and subventricular zone (SVZ). It was also verified a reduction in immature neurons (Doublecortin – DCX) and reduced survival, differentiation, and maturation of newborn neurons (BrdU/NeuN), resulting in impairments in short-term spatial memory in the object location test (OLT) and in the Y maze, and in long-term spatial memory in the contextual fear conditioning. These results further support previous reports of a detrimental effect of neuroinflammation on adult neurogenesis. In the second part of the present work, the curcumin effects in the sAD model induced by STZ-ICV were assessed. Curcumin is a natural polyphenol with evidence of antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties. Recent evidence also suggests that curcumin increases cognitive performance in animal models of dementia, and this effect would be related to its capacity to enhance adult neurogenesis. The aim of the second part of this work was to test the hypothesis that oral prolonged curcumin treatment would be able to preserve cognitive functions by increasing adult neurogenesis and decreasing neuroinflammation in the sAD model induced STZ-ICV. The animals were injected with STZ-ICV or vehicle and curcumin treatment (25, 50 and 100 mg/kg, gavage) was performed for 30 days, starting 1 h before the stereotaxic surgery. Four weeks after surgery, STZ-lesioned animals exhibited impairments in short-term spatial (TLO and Y maze) and recognition memory (object recognition test - ORT), decreased cell proliferation (Ki-67) and immature neurons (DCX) in the SVZ and DG of hippocampus, and increased immunoreactivity for the glial markers GFAP and Iba-1. Curcumin treatment in the doses of 50 and 100 mg/kg prevented the deficits in short-term recognition memory in the ORT, but not in short-term spatial memory in the OLT and Y maze. All of the curcumin doses tested exerted only slight improvements in neuroinflammation (glial reactivity), resulting in absence of significant effects on hippocampal and subventricular neurogenesis. These results suggest a positive effect of curcumin in short-term object recognition memory which was not related with enhancement in adult neurogenesis.

Keywords: Alzheimer's disease. Curcumin. Adult Neurogenesis.
Neuroinflammation. Memory. Streptozotocin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--|---|
| A β - beta amiloide | GFAP - glial fibrillary acidic protein |
| AChE - acetilcolinesterase | Iba-1 - ionized calcium binding adaptor molecule-1 |
| APP - proteína precursora amiloide | ICV - intracerebroventricular |
| sAPP - proteína precursora amiloide solúvel | IFN γ - interferon- γ |
| BDNF - brain-derived neurotrophic factor | IHQ - imunohistoquímica |
| BrdU - 5-bromo-2'-deoxiuridina | IL- interleucina |
| BSA - albumina do soro bovino | LCE - labirinto em cruz elevado |
| CA - campo aberto | NF- κ B - nuclear factor-kappa B |
| CC - corpo caloso | NMDA - N-metil-D-aspartato |
| CCG - camada celular granular | PBS - phosphate-buffered saline |
| CM - camada molecular | PSA-NCAM - polysialynated-neural cell adhesion molecule |
| ChAT - colina acetiltransferase | TBS - Tris-buffered saline |
| CMC - condicionamento de medo ao contexto | TNF- α - tumor necrosis factor alpha |
| CPN - células progenitoras neurais | TLO - teste de localização de objetos |
| CTN - células tronco neurais | TRO - teste de reconhecimento de objetos |
| DA - doença de Alzheimer | SNC - sistema nervoso central |
| DAB - diaminobenzidina | STZ - estreptozotocina |
| DCX - Doublecortin | VEGF - vascular endothelial growth factor |
| GABA - gamma-aminobutyric acid | VLs - ventrículos laterais |
| GD - giro denteado | ZSG - zona subgranular |
| GDNF - glial cell line-derived neurotrophic factor | ZSV - zona subventricular |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER..... | 11 |
| 1.2 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA DOENÇA DE ALZHEIMER | 12 |
| 1.3 RESISTÊNCIA CEREBRAL À INSULINA NA DOENÇA DE ALZHEIMER. | 14 |
| 1.4 MODELO ANIMAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA..... | 15 |
| 1.5 NEUROGÊNESE ADULTA | 16 |
| 1.5.1 Neurogênese a partir da zona subventricular | 17 |
| 1.5.2 Neurogênese a partir da zona subgranular (ZSG) do giro denteado..... | 19 |
| 1.5.3 Possível significado funcional da neurogênese adulta | 21 |
| 1.5.4 Neurogênese na doença de Alzheimer e em modelos animais..... | 22 |
| 1.5.5 Modulação da neurogênese adulta | 24 |
| 1.5.6 Inflamação na DA e sua influência sobre a neurogênese adulta..... | 25 |
| 1.6 EVIDÊNCIAS TERAPÊUTICAS DA CURCUMINA | 28 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 32 |
| 3 OBJETIVOS..... | 32 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 32 |
| 3.1.1 Objetivos específicos..... | 32 |
| 4 MÉTODOS | 33 |
| 4.1 ANIMAIS..... | 33 |
| 4.2 DROGAS..... | 34 |
| 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 34 |
| 4.4 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA..... | 37 |
| 4.5 TESTE DO CAMPO ABERTO (CA) | 38 |
| 4.6 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE) | 39 |
| 4.7 TESTE DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS (TLO) E DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (TRO) | 39 |
| 4.8 TESTE DO LABIRINTO EM Y – VERSÃO ESPACIAL | 41 |
| 4.9 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO | 42 |
| 4.10 IMUNOHISTOQUÍMICA | 43 |
| 4.11 COLORAÇÃO DE NISSL COM CORANTE TIONINA..... | 46 |
| 4.12 WESTERN BLOT PARA QUANTIFICAÇÃO DE BDNF | 46 |
| 4.13 QUANTIFICAÇÃO DE TNF- α POR ELISA..... | 47 |

| | |
|--|------------|
| 4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 47 |
| 5 RESULTADOS..... | 48 |
| 5.1 PARTE 1 - RESULTADOS REFERENTES AOS EXPERIMENTOS 1 E 2. | 48 |
| 5.1.1 Caracterização comportamental geral do modelo STZ-ICV | 48 |
| 5.1.2 Uma única injeção ICV bilateral de STZ causou prejuízos cognitivos | 50 |
| 5.1.3 Os animais lesados com STZ apresentaram severa neuroinflamação ... | 50 |
| 5.1.4 Efeitos da STZ-ICV sobre a neurogênese na ZSV e no GD do hipocampo | 57 |
| 5.2 PARTE 2 - RESULTADOS REFERENTES AO EXPERIMENTO 3..... | 61 |
| 5.2.1 Caracterização comportamental não cognitiva dos animais lesados com STZ-ICV e tratados com curcumina | 61 |
| 5.2.2 A injeção ICV de STZ causou prejuízos cognitivos que foram parcialmente prevenidos pelo tratamento prolongado com curcumina | 63 |
| 5.2.3 Efeitos da curcumina na neurogênese em animais lesados com STZ | 65 |
| 5.2.4 Efeitos da curcumina nos marcadores gliais em animais lesados com STZ | 69 |
| 6 DISCUSSÃO | 75 |
| 7 CONCLUSÃO | 86 |
| REFERÊNCIAS..... | 88 |
| ANEXOS | 100 |

1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa progressiva mais frequente na população idosa, atingindo principalmente pessoas acima de 65 anos em todo o mundo (CORREIA et al., 2011). Descrita pela primeira vez em 1906 por Alois Alzheimer e Emil Kraepelin, a DA foi designada inicialmente como demência pré-senil. Posteriormente, por sugestão de Kraepelin, recebeu o nome de doença de Alzheimer (MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997). Estima-se que em 2015 cerca de 47 milhões de pessoas sofriam de demência no mundo todo e 9,9 milhões de novos casos são diagnosticados a cada ano. A DA é considerada a forma mais comum de demência primária e pode corresponder a 60-70% de todos os casos de demência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A DA é caracterizada clinicamente por declínio cognitivo progressivo, o qual envolve, desde a fase inicial da doença, o prejuízo na memória episódica de curto prazo (AULD et al., 2002). A memória episódica se refere a episódios, eventos ou experiências da vida pessoal de um indivíduo e integra os componentes “o que”, “onde”, “quando” de um episódio. Um exemplo de memória episódica pode ser o primeiro dia de aula de uma pessoa. Esta memória envolve várias etapas como aquisição, consolidação e evocação que são dependentes de regiões do lobo temporal medial como o hipocampo e os córtices parahipocampal, entorrinal e perirrinal (DERE; PAUSE; PIETROWSKY, 2010; MATTHEWS, 2015). Além disso, os pacientes apresentam desorientação temporal e espacial desde os estágios iniciais (TU et al., 2015). Em contraste, outras funções cognitivas, como as memórias procedural e semântica, são relativamente preservadas nos estágios iniciais, mas podem estar afetadas nos estágios mais avançados (AULD et al., 2002). A memória semântica se refere ao conhecimento geral adquirido sobre o mundo, que inclui fatos e conceitos sem ter, necessariamente, relação com eventos autobiográficos específicos, por exemplo, a capital de um país. Esta memória depende das regiões anterior e ínfero-lateral do lobo temporal. A memória de procedimentos se refere a habilidades cognitivas e comportamentais adquiridas com a prática que subsequentemente se operam de forma automática, como andar de bicicleta e

dirigir um carro. Esta memória é dependente dos gânglios basais, cerebelo e córtex motor (MATTHEWS, 2015).

Os pacientes com DA também apresentam deterioração das funções psicossociais, perda de vocabulário com consequente redução das habilidades de comunicação, perda progressiva de memória, incapacidade para o auto cuidado e mudanças de personalidade (WEINSTOCK; SHOHAM, 2004). Adicionalmente, muitos pacientes apresentam diversas alterações neuropsiquiátricas como agitação psicomotora, apatia, depressão, ansiedade, alucinações e ilusões (CUMMINGS et al., 2016; ROSENBERG; NOWRANGI; LYKETSOS, 2015). Esta doença provoca morte prematura do paciente, geralmente entre 3-9 anos após o diagnóstico (CORREIA et al., 2011).

1.1 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Neuropatologicamente, a doença se caracteriza pela perda de sinapses e degeneração de neurônios, particularmente de neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal. Esses neurônios colinérgicos degenerados possuem os seus corpos celulares localizados em duas regiões: (1) no núcleo septal medial, o qual inerva predominantemente o hipocampo e; (2) no núcleo basal de Meynert, o qual inerva a amígdala e amplas regiões do córtex cerebral, como as regiões frontal, parietal e temporal (AULD et al., 2002; WEINSTOCK; SHOHAM, 2004). Além disso, estudos mostram redução na atividade e nos níveis de RNA mensageiro da enzima colina acetiltransferase (ChAT) no lobo temporal e córtices frontal e parietal de cérebros de pacientes com DA (AULD et al., 2002). Paralelamente à degeneração colinérgica, a DA é bem caracterizada pelo o acúmulo de agregados proteicos. Muitos estudos, incluindo os de Braak e colaboradores, demonstraram a presença extracelular de agregados da proteína β -amiloide ($A\beta$) que formam as placas amiloides ou senis. Também foi demonstrada a presença intracelular de agregados da proteína tau na forma hiperfosforilada conhecidos como emaranhados neurofibrilares (BRAAK; BRAAK, 1991). A densidade e a difusão dos emaranhados neurofibrilares da tau aumenta conforme o avanço da doença. Isto permitiu a classificação da DA em seis estágios por Braak e colaboradores (BRAAK et al., 2006). A presença de pré-emaranhados e emaranhados da tau

é detectada desde os estágios mais iniciais (estágio I de Braak) até o mais avançado (estágio 6 de Braak) da doença, diferente das placas amiloides que apresentam menor correlação com os estágios de Braak (BRAAK et al., 2011; BRAAK; DEL TREDICI, 2012). Muitos estudos *post-mortem*, mostram que a atividade da ChAT em regiões corticais de cérebros com a DA apresenta uma correlação negativa significativa, mas variável, com a densidade de placas amiloides. Além disso, há relatos de associação positiva entre a densidade de emaranhados neurofibrilares e a degeneração colinérgica em muitas áreas corticais de cérebros de pacientes com DA (AULD et al., 2002). A evolução dos pré-emaranhados e emaranhados da tau em neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal mostrou correlação positiva com o desenvolvimento de prejuízo cognitivo em pacientes com DA (VANA et al., 2011)

Até o momento, a DA é considerada incurável e os tratamentos disponíveis são apenas sintomáticos. Alguns inibidores não competitivos e reversíveis da acetilcolinesterase (AChE), enzima que degrada a acetilcolina na fenda sináptica, estão disponíveis comercialmente para o tratamento sintomático da DA leve a moderada. Os inibidores da AChE disponíveis para uso clínico atualmente são o donepezil, a galantamina e a rivastigmina. A memantina, antagonista não competitivo de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) do glutamato, também foi aprovada para o tratamento sintomático da DA moderada a severa. Sugere-se que esses fármacos consigam manter o status cognitivo por até um ano e até desacelerar a deterioração cognitiva, porém, o avanço da neurodegeneração até o momento é inevitável (AULD et al., 2002; MANGIALASCHE et al., 2010). Dessa forma, grandes esforços vêm sendo feitos para o desenvolvimento de novas drogas com outros mecanismos de ação capazes de deter o processo degenerativo e melhorar as funções cognitivas dos pacientes. Dentre estas drogas está a curcumina, substância pleiotrópica encontrada nas raízes do açafrão, objeto de estudo deste trabalho e que será abordada em mais detalhes adiante.

1.2 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA apresenta etiologia desconhecida até o momento. Provavelmente, esta doença resulte da combinação de diversos fatores de risco genéticos e

ambientais, sendo, portanto considerada multifatorial. A patogênese da DA também não está totalmente esclarecida. Sabe-se que há o envolvimento de diversos mecanismos moleculares que podem conduzir à morte celular. Evidências crescentes sugerem a participação da neuroinflamação crônica na DA devido à presença de micróglia ativada nas proximidades das placas amiloides e ao aumento de mediadores inflamatórios derivados da micróglia. (CAMERON; LANDRETH, 2010). A excitotoxicidade tem sido implicada como uma das causas de morte neuronal na DA. Esta ocorre provavelmente como consequência da liberação e/ou inibição da captação de glutamato pelos astrócitos reativos mediado pela proteína A β (ACOSTA; ANDERSON; ANDERSON, 2017). Alterações oxidativas também têm sido observadas tanto no cérebro quanto no sangue periférico de pacientes com DA. Danos oxidativos, i.e., peroxidação lipídica, nitração, modificações protéicas do tipo carbonil e oxidação de ácidos nucleicos, estão aumentados em pacientes com DA em comparação com controles normais (BONDA et al., 2010). Além disso, anormalidades na estrutura e função das mitocôndrias foram observadas no cérebro e sistemicamente em pacientes com a DA. As atividades de várias enzimas mitocondriais envolvidas com o metabolismo energético como a citocromo oxidase e os complexos da α -cetoglutarato desidrogenase e da piruvato desidrogenase estão reduzidas na DA (SELFRIDGE et al., 2013).

Em uma pequena parte dos casos, a DA apresenta origem genética (DA familiar de início precoce) e está relacionada a mutações hereditárias autossômicas dominantes em três genes: proteína precursora amiloide (APP), e presenilinas 1 e 2. Estas mutações levam à geração permanente de fragmentos A β que se depositam como placas amiloides ou senis. Isto levou à formulação da “hipótese da cascata amiloide”, a qual propõe que as causas da DA estão relacionadas à produção aumentada da proteína A β , como consequência da perturbação do processo que regula a clivagem proteolítica da APP, gerando agregados da proteína A β . Porém, a maior parte dos casos de DA são de início tardio (após os 65 anos de idade), não exibem herança autossômica dominante e são de causa desconhecida, sendo chamados, portanto, de esporádicos ou idiopáticos (KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015).

A hipótese da cascata amiloide propõe que, tanto na forma familiar quanto na esporádica da DA, as alterações neuropatológicas são consequência do acúmulo aberrante de A β . Contudo, para a forma esporádica da DA não se sabe a origem dos agregados proteicos e existem poucas evidências de que a presença destes seja necessária para o desenvolvimento e progressão da doença (CORREIA et al., 2011, 2012). Para os casos esporádicos, o envelhecimento, o diabetes mellitus tipo 2, a resistência à insulina, a síndrome metabólica, a obesidade, alelo ϵ 4 da apolipoproteína E4, hipercolesterolemia, hipertensão, inatividade física e intelectual, baixa escolaridade, isolamento social, depressão e tabagismo são considerados os principais fatores de risco (SCHELTENS et al., 2016; SERY et al., 2013).

1.3 RESISTÊNCIA CEREBRAL À INSULINA NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Distúrbios precoces no metabolismo cerebral da glicose e na sinalização pela insulina vêm sendo implicados na patogênese da DA esporádica (CORREIA et al., 2011, 2012). O cérebro é altamente dependente da glicose como fonte de energia e o seu metabolismo oxidativo é fundamental para a homeostase celular e atividade sináptica. Os neurônios são dependentes do transporte de glicose através da barreira hematoencefálica por um processo dependente de insulina e qualquer anormalidade na microcirculação pode comprometer a absorção de nutrientes. Em pacientes com DA, o fluxo sanguíneo cerebral está reduzido, provavelmente por disfunção da microvasculatura. Os microvasos também exibem menor densidade de transportadores de glicose, GLUT 1 e 3, no endotélio, o que favorece o comprometimento do metabolismo energético cerebral. Em pacientes em estágio inicial de DA, demonstrou-se por tomografia de emissão de pósitrons que o metabolismo da glicose está reduzido em 30-50% nas regiões parietal, temporal e cingulado posterior do córtex cerebral (WEINSTOCK; SHOHAM, 2004).

Demonstrou-se que pacientes com a DA esporádica exibem níveis de insulina menores no fluido cérebro espinhal e maiores no plasma; além disso, em cérebros *post-mortem* de pacientes com a DA foi observada uma redução na densidade dos receptores de insulina e na atividade da tirosina quinase

(porção intracelular do receptor de insulina). Isso sugere que anormalidades na transdução de sinal no receptor de insulina são fatores importantes que podem estar associados à DA esporádica (BUTTERFIELD; DI DOMENICO; BARONE, 2014). Além das alterações na funcionalidade do receptor de insulina, alterações na expressão gênica cerebral também foram observadas. Genes envolvidos no diabetes mellitus não dependente de insulina (tipo 2) e na obesidade têm a sua expressão significativamente alterada especialmente no hipocampo e, em menor grau, nos córtices frontal e temporal de pacientes com a DA e em modelo animal transgênico para DA. As alterações encontradas no perfil de expressão dos genes relacionados ao diabetes se mostraram independentes de anormalidades periféricas relacionadas ao diabetes. Isso sugere que a alteração no perfil de expressão de genes relacionados ao diabetes nos cérebros *post-mortem* de pacientes com a DA é um resultado do processo patológico da DA e não do diabetes, mas que poderia ser acelerado pela resistência à insulina (HOKAMA et al., 2014). Devido a essas características, alguns autores defendem a existência de um “estado de resistência cerebral à insulina” na DA (BUTTERFIELD; DI DOMENICO; BARONE, 2014; CORREIA et al., 2011).

1.4 MODELO ANIMAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Em concordância com a hipótese mencionada acima, um novo modelo animal não transgênico tem sido proposto como representativo da DA esporádica. Este modelo animal vem sendo desenvolvido por injeção intracerebroventricular (ICV) de doses baixas (0,1 a 3 mg/kg) e subdiabetogênicas da droga estreptozotocina (STZ) em roedores (KNEZOVIC et al., 2015; SALKOVIC-PETRISIC et al., 2013) e, mais recentemente, em primatas não humanos (PARK et al., 2015; YEO et al., 2015). Quando injetada sistemicamente, a STZ mimetiza o diabetes mellitus do tipo 1, por destruir as células β -pancreáticas produtoras de insulina. A injeção de baixas doses de STZ nos ventrículos laterais do cérebro de animais produz muitas características semelhantes à DA. Dentre essas características estão o estresse oxidativo (AGRAWAL et al., 2009, 2010; EJAZ AHMED et al., 2013; ISHRAT et al., 2009; SHARMA; GUPTA, 2001), neuroinflamação (CHEN et al.,

2012; KRASKA et al., 2012; PRICKAERTS; FAHRIG; BLOKLAND, 1999), danos ao sistema colinérgico cerebral (AGRAWAL et al., 2009; PRICKAERTS; FAHRIG; BLOKLAND, 1999), aumento de expressão de tau total/hiperfosforilada e A β (SALKOVIC-PETRISIC et al., 2006; SANTOS et al., 2012), formação de agregados positivos para a proteína A β (SALKOVIC-PETRISIC et al., 2011); prejuízos no metabolismo energético cerebral (HOYER et al., 1996; LANNERT et al., 1998; LANNERT; HOYER, 1998; NITSCH; HOYER, 1991) e disfunção nos receptores de insulina cerebrais (AGRAWAL et al., 2009; GRÜNBLATT et al., 2007; OSMANOVIC BARILAR et al., 2015; RAJASEKAR et al., 2016), resultando em déficits cognitivos como prejuízos na memória e orientação espacial (SALKOVIC-PETRISIC et al., 2013). O tratamento com o anticolinesterásico donepezil mostrou prevenir e reverter o prejuízo cognitivo neste modelo (AGRAWAL et al., 2009). A STZ entra nas células através de transportadores de glicose e sofre decomposição gerando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico, o que causa estresse oxidativo nos tecidos adjacentes (KWON et al., 1994; TAKASU et al., 1991). O estresse oxidativo danifica os neurônios, desencadeando uma pronunciada neuroinflamação (WEINSTOCK; SHOHAM, 2004). Além dos fatores mencionados, evidências crescentes sugerem que disfunções nos processos de neurogênese adulta podem desempenhar um papel importante no processo neurodegenerativo e no prejuízo cognitivo observado em pacientes com a DA (EKONOMOU et al., 2015; PERRY et al., 2012; WALDAU; SHETTY, 2008) bem como no modelo da STZ-icv (QU et al., 2012; SUN et al., 2015).

1.5 NEUROGÊNESE ADULTA

A neurogênese adulta é o processo em que células tronco neurais (CTN) sofrem mitose e se diferenciam para gerar novos neurônios no cérebro adulto dos mamíferos. A neurogênese adulta já é bem descrita em áreas restritas do SNC conhecidas como nichos neurogênicos, os quais são: a zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais e a zona subgranular (ZSG) do giro denteado (GD) do hipocampo. Em ambas as regiões, residem CTN que correspondem a uma subpopulação especializada de astrócitos do tipo glia radial. Essas CTN consideradas relativamente quiescentes sofrem divisão

assimétrica dando origem às células progenitoras neurais (CPN), que por sua vez se dividem dando origem a um grande número de neuroblastos migratórios (MING; SONG, 2005; VADODARIA; GAGE, 2014). Na ZSV dos ventrículos laterais, os neuroblastos migram para o bulbo olfatório através do fluxo migratório rostral na maioria dos mamíferos (TONG; ALVAREZ-BUYLLA, 2014), exceto no ser humano, no qual evidências recentes sugerem a migração desses neuroblastos para o estriado, onde se diferenciam em interneurônios estriatais (ERNST et al., 2014). Nos outros mamíferos, a maior parte dos neuroblastos que migram para o bulbo olfatório se diferenciam em interneurônios GABAérgicos granulares e interneurônios periglomerulares dopaminérgicos. Os neuroblastos que nascem na ZSG migram para a camada celular granular (CCG) do giro denteado do hipocampo, onde se diferenciam em células granulares glutamatérgicas e/ou gabaérgicas (HANSON; OWENS; NEMEROFF, 2011).

Além dos nichos neurogênicos descritos, muitos estudos sugerem outras áreas de possível neurogênese adulta como o neocórtex, córtex piriforme, estriado, amígdala, hipotálamo, tubérculo olfatório e substância negra. Entretanto, observou-se que em todas essas regiões a neurogênese adulta ocorre em taxas muito baixas e somente em condições não fisiológicas como em resposta a uma lesão tecidual (VON BOHLEN UND HALBACH, 2011).

Os novos neurônios no cérebro adulto se desenvolvem ao longo de várias fases que são semelhantes, mas não totalmente iguais para os dois nichos neurogênicos. Essas fases podem ser separadas didaticamente conforme descrito a seguir.

1.5.1 Neurogênese a partir da zona subventricular

As CTN do tipo glia radial residem abaixo de uma camada de células endoteliais que se situam nas paredes da porção dorso-ventral dos ventrículos laterais (FIGURA 1). Na ZSV, essas CTN do tipo glia radial são chamadas de células B1 e expressam os marcadores glial fibrillary acidic protein (GFAP) e nestin (BRAUN; JESSBERGER, 2014; TONG; ALVAREZ-BUYLLA, 2014).

Fase 1 (proliferação): a população de células B1 se divide para gerar as células amplificadoras transitórias não radiais (células tipo C), que expressam

predominantemente Sox-2 e se proliferam rapidamente para gerar grandes quantidades de neuroblastos migratórios (células do tipo A) (BRAUN; JESSBERGER, 2014; TONG; ALVAREZ-BUYLLA, 2014).

Fase 2 (diferenciação): os neuroblastos passam a expressar Doublecortin (DCX), Dlx2 e polysialynated-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM). Muitos sinais neurogênicos liberados pelas células endoteliais influenciam na diferenciação (MING; SONG, 2005).

Fase 3 (migração): na maioria dos mamíferos, exceto para o ser humano, os neuroblastos e neurônios imaturos migram por meio do fluxo migratório rostral até o bulbo olfatório. Essa migração em cadeia ocorre ao longo de uma estrutura tubular formada por células gliais. Os neuroblastos ainda expressam PSA-NCAM, DCX e Dlx-2 nessa fase (BRAUN; JESSBERGER, 2014; ERNST et al., 2014).

Fase 4 (integração sináptica): os neuroblastos que atingem o bulbo olfatório se diferenciam preferencialmente em interneurônios GABAérgicos granulares e interneurônios periglomerulares dopaminérgicos que se integram aos circuitos neurais pré-existentes ao longo de aproximadamente três semanas. Nessa fase os neurônios maduros expressam os marcadores neuronais pós-mitóticos Calretin, Calbindin e NeuN (BRAUN; JESSBERGER, 2014).

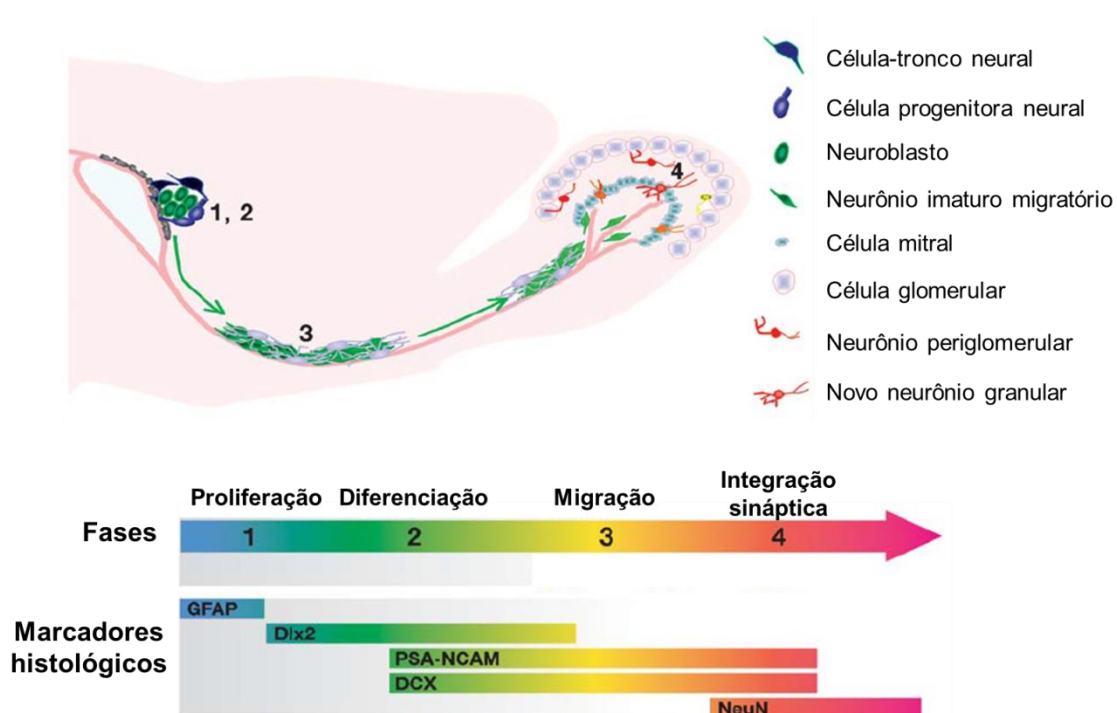


FIGURA 1 - NEUROGÊNESE ADULTA A PARTIR DA ZONA SUBVENTRICULAR (ZSV). A neurogênese no sistema olfatório/ZSV ocorre a partir da proliferação das células tronco neurais residentes na ZSV dos ventrículos laterais. Essas células dão origem às células amplificadoras transitórias (ou células progenitoras neurais) que se diferenciam em neuroblastos e neurônios imaturos migrantes. As células ependimais adjacentes a ZSV (cinza) secretam inibidores de gliogênese, sendo assim essenciais à diferenciação neuronal. Os neuroblastos e neurônios imaturos migram pelo fluxo migratório rostral até o bulbo olfatório, onde migram radialmente para as camadas mais externas. Os neurônios imaturos então se diferenciam em interneurônios periglomerulares (vermelho) ou interneurônios granulares (laranja). Fonte: Adaptado de: MING; SONG (2005).

1.5.2 Neurogênese a partir da zona subgranular (ZSG) do giro denteado

A ZSG do giro denteado do hipocampo é uma fina camada onde residem as células tronco neurais do tipo glia radial (tipo 1) que são GFAP e Nestin-positivas (FIGURA 2).

Fase 1 (proliferação): as células tipo 1 se dividem assimetricamente produzindo células do tipo 2 (também chamadas de células progenitoras neurais) enquanto mantém a morfologia de células tipo 1. As células tipo 2 se dividem simetricamente, em um taxa muito maior que as do tipo 1, e expressam Nestin, DCX e PSA-NCAM (AIMONE et al., 2014; MING; SONG, 2005).

Fase 2 (diferenciação): as células do tipo 2 se diferenciam em células do tipo 3, as quais são neuroblastos migratórios que continuam a se dividir, deixam de expressar Nestin mas continuam expressando DCX e PSA-NCAM. Uma pequena porcentagem dessas células proliferativas sobrevive e se diferencia em neurônios imaturos (HANSON; OWENS; NEMEROFF, 2011; VADODARIA; GAGE, 2014).

Fase 3 (migração): as células tipo 3 mudam a orientação dos seus processos neuronais de horizontal para vertical (perpendicular à camada celular granular) e começam a migrar para a camada celular granular. Quando esses neurônios imaturos deixam de se dividir, atingem o estágio de células tipo 4 (AIMONE et al., 2014; HANSON; OWENS; NEMEROFF, 2011).

Fase 4 (segmentação de axônios e dendritos): as células do tipo 4 pós-mitóticas estendem os seus dendritos para a camada molecular do giro denteado, onde fazem conexões com o córtex entorinal, e os seus axônios para a área CA3 do hipocampo, através da “via de fibras musgosas”, e passam a expressar Calretinin e NeuN. Aproximadamente 2-3 semanas após cessarem

a mitose, as células do tipo 4 deixam de expressar Calretinin e passam a expressar Calbindin, quando se tornam células granulares maduras (AIMONE et al., 2014; HANSON; OWENS; NEMEROFF, 2011).

Fase 5 (integração sináptica): nesse momento, esses neurônios granulares apresentam plasticidade sináptica aumentada e suas propriedades eletrofisiológicas lembram as de neurônios do período pós-natal. Nessa fase as células são hiperexcitáveis. Isso ocorre aproximadamente 4-6 semanas após a primeira divisão celular. Ao todo, são necessárias até 7 semanas para que os novos neurônios se tornem funcionalmente indistinguíveis das células granulares maduras geradas antes do nascimento (HANSON; OWENS; NEMEROFF, 2011; VADODARIA; GAGE, 2014).

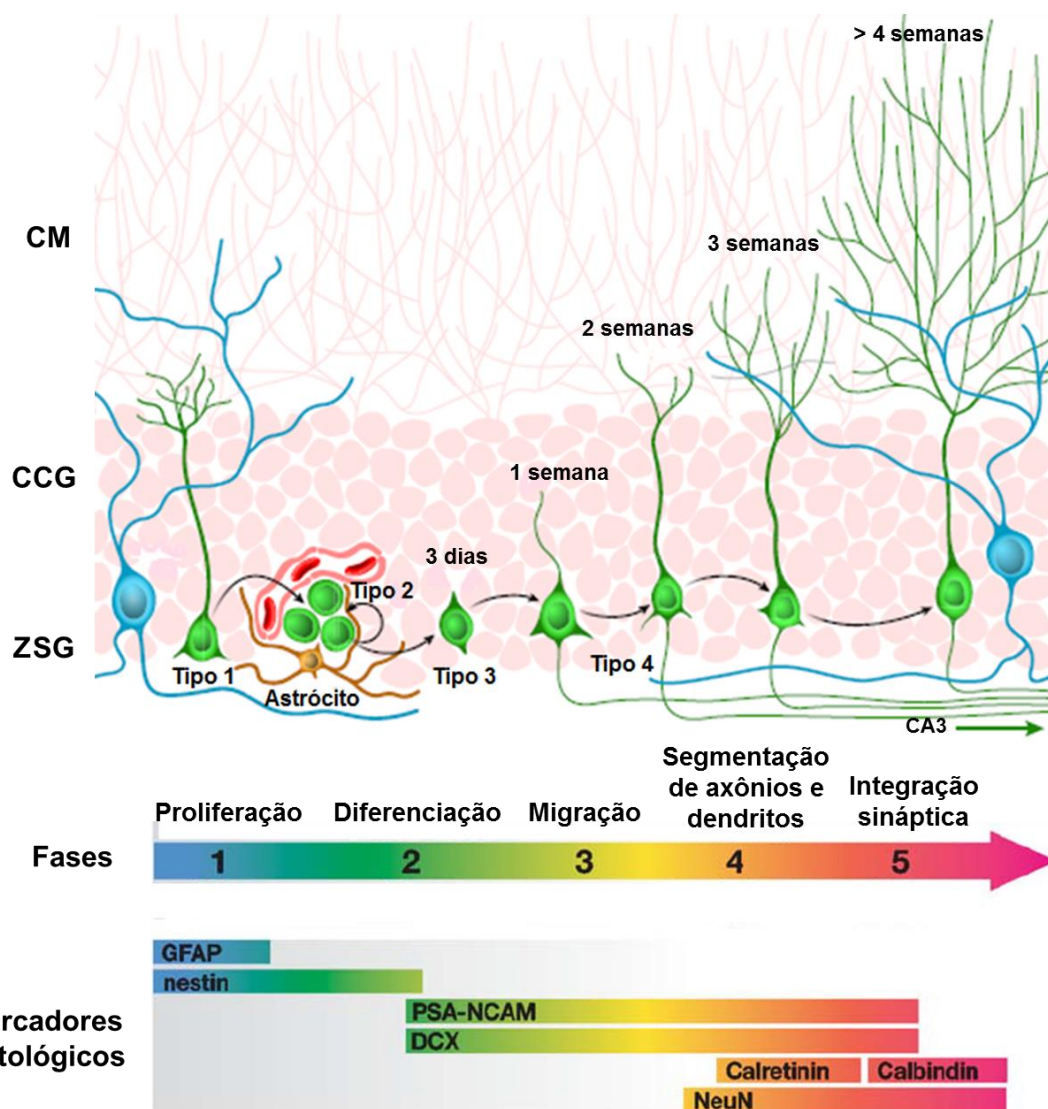


FIGURA 2 - NEUROGÊNESE ADULTA A PARTIR DA ZONA SUBGRANULAR (ZSG) DO GIRO DENTEADO (GD) DO HIPOCAMPO. As células tronco neurais (tipo 1) residentes na ZSG do GD proliferam dando origem às células amplificadoras transitórias (ou células progenitoras neurais ou tipo 2). Essas células estão fortemente associadas aos astrócitos e

vasos sanguíneos no nicho neurogênico. As células tipo 2 se diferenciam em neuroblastos (tipo 3) e migram por uma curta distância até a camada celular granular (CCG) onde se diferenciam em neurônios imaturos. Estes iniciam a segmentação dos axônios que se estendem em direção às células piramidais da área CA3 do hipocampo e dos dendritos que se estendem para a camada molecular (CM) do GD. Os novos neurônios granulares estabelecem novas sinapses através da entrada pelo córtex entorinal e saída para a área CA3 do hipocampo. Fonte: Adaptado de AIMONE et al. (2014) e MING; SONG (2005).

1.5.3 Possível significado funcional da neurogênese adulta

O papel que os novos neurônios desempenham na cognição e comportamento dos animais é ainda pouco conhecido. A taxa de neurogênese adulta é regulada por experiências e fatores ambientais, o que é uma evidência indireta de que esses novos neurônios participam das interações dos indivíduos com o ambiente (CAMERON; GLOVER, 2015). Muitas evidências indicam que os neurônios novos no bulbo olfatório dos animais contribuem para a memória olfativa, enquanto que os neurônios novos do giro denteado contribuem para o aprendizado e memória dependentes do hipocampo (BRAUN; JESSBERGER, 2014). Níveis aumentados de neurogênese hipocampal se correlacionam com um melhor desempenho em tarefas de memória espacial como o labirinto aquático de Morris (KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1997; VAN PRAAG et al., 1999), na memória de reconhecimento de objetos (JESSBERGER et al., 2009), no condicionamento de medo (SHORS et al., 2001) e na separação de padrões, um processo que transforma experiências, contextos ou representações similares em representações neurais distintas e não sobrepostas (SAHAY et al., 2011). Além disso, os novos neurônios podem desempenhar um papel essencial na flexibilidade cognitiva e comportamental, revelado pela inabilidade de aprendizado espacial reverso no labirinto aquático de Morris quando há redução na neurogênese. Esses novos neurônios permitiriam a adaptabilidade do indivíduo a mudanças e novidades no ambiente (GARTHE; BEHR; KEMPERMANN, 2009). A persistência da neurogênese ao longo da vida também poderia permitir a reparação parcial de lesões cerebrais pelas células tronco, tanto após lesões agudas como isquemia cerebral durante um acidente vascular encefálico, quanto em processos neurodegenerativos crônicos como nas doenças de Alzheimer e Parkinson (BRAUN; JESSBERGER, 2014). Ainda, sugere-se que a neurogênese

hipocampal participe do controle emocional, humor e respostas ao estresse (BRAUN; JESSBERGER, 2014; CAMERON; GLOVER, 2015).

Recentemente, evidências importantes da participação da neurogênese adulta na cognição humana foram observadas. Demonstrou-se que indivíduos cognitivamente normais, mas com a neuropatologia da DA apresentavam números elevados de CTN e de novos neurônios no GD do hipocampo. O número de CTN positivas para Sox-2 se correlacionou com a capacidade cognitiva dos indivíduos, o que apoia o papel da neurogênese em mediar, pelo menos em parte, a capacidade desses indivíduos em permanecer cognitivamente normais apesar das alterações neuropatológicas da DA (BRILEY et al., 2016).

1.5.4 Neurogênese na doença de Alzheimer e em modelos animais

Alterações no processo de neurogênese adulta foram evidenciadas em muitos estudos de tecidos *post-mortem* de pacientes acometidos pela DA e em vários modelos animais. Muitos trabalhos mostram resultados contraditórios e o aumento ou redução da neurogênese em pacientes e modelos animais parece ser dependente da fase da doença e da etapa da neurogênese. Observou-se o aumento da expressão de marcadores de neuroblastos e neurônios imaturos quanto mais avançado o estágio de Braak da DA em tecidos *post-mortem*, porém sem aumento de marcadores de neurônios maduros. Isto sugere um aumento compensatório da neurogênese em resposta à neurodegeneração, sem resultar em um número maior de neurônios (JIN et al., 2003). Em outro estudo *post-mortem*, verificou-se a redução do marcador de células tronco musashi-1 e de ChAT e, inversamente, aumento de marcadores de CPN proliferativas (Nestin-positivas) quanto mais avançado o estágio de Braak da DA, no entanto, sem alterações importantes em marcadores de diferenciação/migração neuronal (DCX/ β -tubulin). Isso sugere uma redução na população de CTN, que pode estar relacionado à deficiência colinérgica, junto com aumento compensatório da proliferação das CPN que, no entanto, não é capaz de aumentar o número de neuroblastos migratórios e neurônios diferenciados (PERRY et al., 2012). Por outro lado, EKONOMOU et al. (2015) observaram redução de neurônios imaturos apenas nos estágios mais

avançados da DA, correlacionado com aumento de marcadores gliais, entretanto, sem aumento significativo de proliferação celular e de neuroblastos. Provavelmente, o aumento compensatório da neurogênese encontrado em alguns estudos não é suficiente para gerar um número maior de neurônios diferenciados, pois a sobrevivência dos novos neurônios está afetada pela severa neurodegeneração e falta de aporte de fatores neurotróficos (WALDAU; SHETTY, 2008).

Em modelos animais da DA, observa-se uma tendência de redução da neurogênese, apesar de poucos relatos contraditórios. JIN et al. (2004) constataram aumento de neurogênese, demonstrado por aumento de incorporação de BrdU (Bromodeoxiuridina, análogo da timidina incorporado ao DNA de células em proliferação) em camundongos transgênicos para APP (PDGF-APP_{Swe,Ind}) tanto jovens (3 meses) quanto idosos (1 ano). Em contraste, FAURE et al. (2011) verificaram redução da proliferação celular e de neurônios imaturos em camundongos APPxPS1-Ki jovens. Em um modelo triplo transgênico (3xTg-AD), foi observada redução progressiva na neurogênese com o aumento da idade dos animais, o que foi correlacionado ao desenvolvimento de agregados positivos para A β (RODRÍGUEZ et al., 2008). HAUGHEY et al. (2002a) também verificaram redução da proliferação e migração de CPN na ZSV de camundongos transgênicos para APP e em camundongos que receberam injeção icv de A β (A β ₁₋₄₂ e A β ₂₅₋₃₅). No mesmo estudo, mostrou-se que a A β suprime a proliferação e diferenciação de CPN em cultura e induz apoptose. Paralelamente, HAUGHEY et al. (2002b) demonstraram que a proliferação e a sobrevivência de CPN também estão reduzidas no GD de camundongos transgênicos para APP. Em outro estudo, a injeção ICV de A β ₂₅₋₃₅ reduziu a formação de novos neurônios (PSA-NCAM-positivos) no hipocampo de ratos Sprague-Dawley (ZUSSY et al., 2013).

No modelo da STZ-ICV, QU et al. (2012) observaram redução de novos neurônios (BrdU/Tuj1-positivos) no GD de ratos Sprague-Dawley, 21 dias após a administração de STZ-ICV, associado com aumento do estresse oxidativo. No mesmo modelo, SUN et al. (2015) encontraram diminuição de neurônios imaturos e maduros no GD de ratos somente a longo prazo (3 meses após injeção de STZ-ICV), mas não a curto prazo (1 mês após STZ-ICV),

apresentando correlação com o desenvolvimento dos agregados A β -positivos. Até o momento, nenhum trabalho havia estudado em conjunto os efeitos da injeção ICV de STZ sobre a neuroinflamação e as disfunções na neurogênese hipocampal e subventricular e o consequente prejuízo na memória espacial de curto e longo prazo.

1.5.5 Modulação da neurogênese adulta

Todo o processo de neurogênese adulta é dinamicamente modulado por fatores extrínsecos e intrínsecos ao indivíduo. Muitos neurotransmissores influenciam as etapas desse processo. Sabe-se que o ácido gama aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório do cérebro, suprime a proliferação das CPN, porém induz a sua diferenciação e sobrevivência. O glutamato, principal neurotransmissor excitatório, estimula a sobrevivência, mas não parece atuar em outras etapas. A serotonina induz a proliferação, a noradrenalina parece estimular a proliferação e a diferenciação, enquanto a dopamina e a acetilcolina são necessárias para a maturação e a sobrevivência (AIMONE et al., 2014). Intervenções terapêuticas com efeito antidepressivo também mostraram aumentar a neurogênese pelo estímulo da proliferação celular e/ou sobrevivência. Entre essas intervenções estão as drogas antidepressivas (i.e., inibidores da recaptação de serotonina, noradrenalina ou duais) e o choque eletroconvulsivo (HANSON; OWENS; NEMEROFF, 2011). Fatores neurotróficos, particularmente o fator neurotrófico derivado do cérebro (Brain-derived Neurotrophic Factor - BDNF) e o fator de crescimento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor - VEGF), regulam a neurogênese no hipocampo. Ambos possuem os seus receptores TrkB e Flk-1, respectivamente, expressos nas células progenitoras neurais, estimulando a proliferação, diferenciação neuronal e sobrevivência. As neurotrofinas parecem aumentar a sobrevivência celular pela inibição de vias apoptóticas (HANSON; OWENS; NEMEROFF, 2011).

Muitos fatores comportamentais extrínsecos ao indivíduo também modulam a formação de novos neurônios. A corrida voluntária é um dos mais potentes indutores da neurogênese conhecidos, estimulando a proliferação das CPN. O enriquecimento ambiental parece ter um efeito complementar,

estimulando a sobrevivência dos neurônios em maturação. O aprendizado suprime a proliferação, mas estimula a diferenciação, maturação e sobrevivência dos novos neurônios. Além disso, a restrição calórica e injúrias teciduais como as induzidas por isquemia ou epilepsia são potentes indutores da proliferação celular. Em contraste, outros fatores extrínsecos são capazes de inibir a neurogênese. O estresse agudo e crônico é um potente inibidor da proliferação das CPN do giro denteado, bem como da sua diferenciação neuronal e sobrevivência. Esse efeito tem sido atribuído aos glicocorticoides liberados na corrente sanguínea pelo estresse. De forma similar, o envelhecimento normal diminui drasticamente a proliferação, diferenciação, maturação e sobrevivência das CPN. O declínio da neurogênese hipocampal relacionado ao envelhecimento normal também pode ocorrer como resultado da redução da população de CTN (AIMONE et al., 2014). Com o envelhecimento, a micróglia e os astrócitos dos nichos neurogênicos são alterados de um estado anti-inflamatório e antioxidante para um estado pró-inflamatório. O processo inflamatório é outro potente regulador negativo da neurogênese e será discutido em seção à parte.

1.5.6 Inflamação na DA e sua influência sobre a neurogênese adulta

A inflamação crônica é uma característica importante da DA e provavelmente participa da sua patogênese e evolução, pois evidências de neuroinflamação são encontradas em cérebros *post-mortem* de pacientes com a DA e estas se correlacionam com o declínio progressivo das funções cognitivas (SIMPSON et al., 2010). A neuroinflamação é representada pelo aumento de astrócitos reativos e micróglia ativada, o que é chamado de astrogliose e microgliose reativas, respectivamente, e pelo aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias liberadas por essas células gliais (FUSTER-MATANZO et al., 2013; SERRANO-POZO et al., 2013).

As células da micróglia são consideradas os macrófagos residentes do SNC e, assim como os macrófagos periféricos, são responsáveis por iniciar a resposta imune após injúrias ou infecções. A micróglia responde através da liberação de mediadores inflamatórios e pela fagocitose de debris celulares ou patógenos, mantendo assim a homeostase do SNC. Sob condições não

patológicas, há um contínuo estado de baixos níveis de ativação microglial, conhecido como estado de repouso em que a micróglia se apresenta com uma morfologia ramificada. Contudo, mediante uma injúria, a micróglia sofre uma transformação morfológica passando do estado ramificado para o estado amebóide, no qual fica indistinguível dos monócitos e macrófagos periféricos e aumenta a expressão e liberação de muitas citocinas, especialmente as interleucinas (IL)-1, IL-2 e IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). As respostas da micróglia são duais. Podem exacerbar um dano ao SNC, especialmente nos estágios agudos, mas também são essenciais ao reparo e remodelação do SNC, especialmente em estágios tardios (KAWABORI; YENARI, 2014).

Os astrócitos são células da glia com grande variedade de funções. Os astrócitos apresentam finos processos citoplasmáticos que fazem contato com muitas sinapses, participam da sua formação, bem como da sincronização e integração de processos sinápticos. Os processos citoplasmáticos da astroglia também envolvem os capilares do SNC, formando os limites gliais da barreira hematoencefálica (DE STROOPER; KARRAN, 2016). Os astrócitos, junto com os oligodendrócitos, sintetizam colesterol e secretam apolipoproteína E e J. Também liberam gliotransmissores (como ATP, glutamato e D-serina) e são responsivos a muitos outros neurotransmissores. Removem o glutamato das sinapses, evitando assim a excitotoxicidade. Em resposta a uma lesão cerebral, os astrócitos podem se tornar reativos, exibindo uma morfologia hipertrófica, com proliferação celular, aumento de expressão de filamentos intermediários (que são positivos para GFAP, Vimentin e Nestin) e expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α , transforming growth factor (TGF)- β e interferon (IFN)- γ (DE STROOPER; KARRAN, 2016; GAO et al., 2013). A micróglia ativada contribui para a ativação dos astrócitos através da liberação de citocinas e, os astrócitos reativos por sua vez, podem reativar a micróglia causando uma injúria secundária (GAO et al., 2013).

Os mecanismos que desencadeiam a inflamação nos pacientes com DA são controversos e pouco conhecidos. Sugere-se que a reação inflamatória crônica ocorra em resposta ao acúmulo de agregados de proteínas A β e tau, os quais seriam neurotóxicos. Um aumento de micróglia ativada e altos níveis de

citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6, proteína C reativa e proteínas do complemento foram verificados em regiões com alta densidade de placas senis e emaranhados neurofibrilares. Altos níveis plasmáticos de TNF- α , IL-1 e IL-6 também foram observados em muitos estudos em pacientes com DA leve a moderada em comparação com controles saudáveis, o que sugere que processos inflamatórios sistêmicos poderiam gerar neuroinflamação (CLARK et al., 2012; MICHAUD et al., 2013). A resposta inflamatória inicialmente pode ser benéfica devido à fagocitose das placas e emaranhados pela micróglia, facilitando a depuração dos agregados e através da secreção de fatores de crescimento como o glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) que estimula a sobrevivência neuronal. Contudo, a ativação crônica de astrócitos e micróglia é conhecida por induzir necrose de neurônios adjacentes pela liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, enzimas proteolíticas, fatores do complemento e aminoácidos excitatórios (FUSTER-MATANZO et al., 2013).

A neuroinflamação aguda e crônica pode influenciar de diferentes formas o processo de neurogênese adulta no cérebro dos mamíferos (WANG; JIN, 2015). A micróglia apresenta um papel dual sobre a neurogênese, podendo estimulá-la ou inibi-la dependendo do seu fenótipo. A micróglia em repouso apresenta efeitos pró-neurogênicos devido à secreção de citocinas anti-inflamatórias e fagocitose dos neurônios imaturos que sofrem apoptose, pois esta ação é benéfica para o nicho neurogênico. Em contraste, a micróglia ativada libera muitas citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , e interferon- γ , que inibem a proliferação, diferenciação e sobrevivência das CPN, resultando em efeitos anti-neurogênicos (FUSTER-MATANZO et al., 2013; WANG; JIN, 2015). Dessa forma, os efeitos da micróglia na neurogênese vão depender do balanço entre as ações e moléculas secretadas anti- e pró-inflamatórias (WANG; JIN, 2015). Devido ao impacto negativo da inflamação crônica sobre a neurogênese adulta e a sua importância na cognição, a modulação da neuroinflamação com drogas anti-inflamatórias como a curcumina poderia diminuir a evolução da DA e favorecer mecanismos endógenos de reparação como a formação de novos neurônios (FUSTER-MATANZO et al., 2013).

1.6 EVIDÊNCIAS TERAPÊUTICAS DA CURCUMINA

A *Curcuma longa*, Linn., conhecida como cúrcuma, açafrão da terra ou açafrão da Índia, é uma planta da família Zingiberaceae, que é nativa do sudeste da Ásia. A cúrcuma é uma especiaria presente no tempero indiano conhecido como curry e faz parte de muitos pratos da culinária asiática. Esta planta vem sendo usada há milhares de anos na medicina tradicional indiana e chinesa (MONROY; LITHGOW; ALAVEZ, 2013). Os principais compostos ativos extraídos dos rizomas da *Curcuma longa* são conhecidos como curcuminóides (FIGURA 3), os quais consistem em curcumina (75-80%), demetoxicurcumina (15-20%) e bisdemetoxicurcumina (3-5%) (HAMAGUCHI; ONO; YAMADA, 2010).

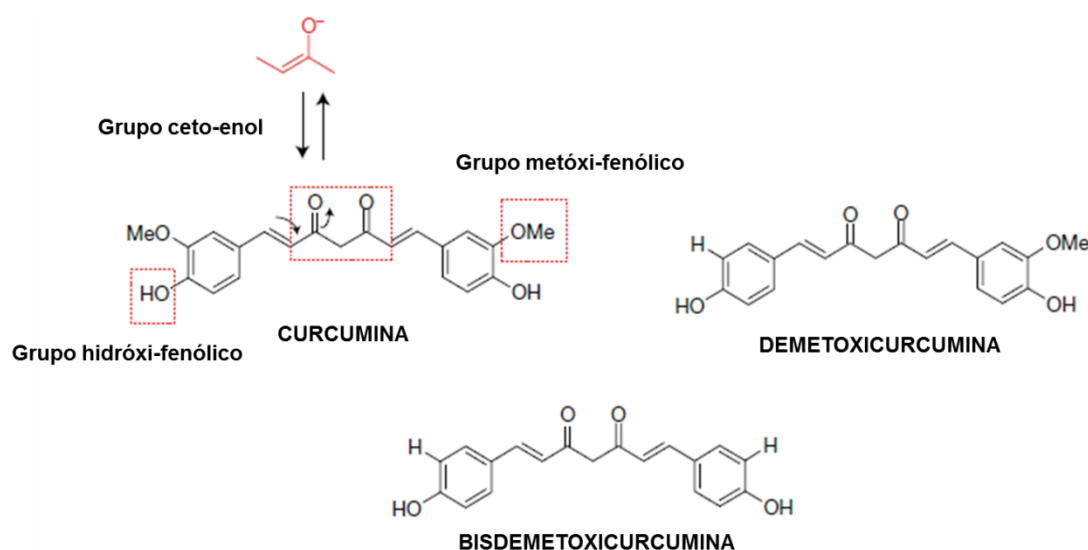


FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS CURCUMINÓIDES E SEUS GRUPOS REATIVOS. A curcumina é o composto 1, 7-bis-(4-hidroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione. Os curcuminóides podem ter até três grupos reativos com um papel importante no estresse oxidativo pela neutralização de radicais livres e quelação de metais. Fonte: Adaptado de: BELKACEMI et al. (2011).

A curcumina, o principal composto polifenólico da *Curcuma longa*, é considerada uma molécula pleiotrópica devido à sua ampla variedade de atividades farmacológicas, incluindo atividades antiinflamatória, antioxidante, antitumoral, cicatrizante de feridas, antimicrobiana e neuroprotetora (MAHESHWARI et al., 2006; MONROY; LITHGOW; ALAVEZ, 2013). A amplitude de atividades farmacológicas da curcumina se deve a sua atuação

em múltiplas vias de sinalização celular e alteração da expressão gênica de muitas proteínas.

Estudos *in vitro* mostraram que a curcumina neutraliza (“scavenger”) ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radicais hidroxila (OH^\bullet), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entre outros radicais livres e atua como quelante de ferro (AK; GÜLÇİN, 2008). Dessa forma, a curcumina consegue preservar *in vivo* os níveis de glutathiona reduzida e reduzir os níveis de malondialdeído e de carbonilações proteicas (BELVIRANLI et al., 2013), além de aumentar a atividade das enzimas glutathiona peroxidase e redutase no cérebro de ratos (ISHRAT et al., 2009). A sua atividade antioxidante também se deve a sua capacidade de induzir a translocação nuclear do *nuclear factor erythroid 2-related factor* (Nrf2), o qual promove a transcrição gênica de múltiplas enzimas antioxidantes endógenas (GONZÁLEZ-REYES et al., 2013).

Ao lado dos seus efeitos antioxidantes, a curcumina também apresenta efeitos antiinflamatórios marcantes *in vitro* e *in vivo*. A curcumina inibe a ativação do fator de transcrição *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) induzida por TNF- α em células humanas mielóides ML-1a *in vitro* (SINGH; AGGARWAL, 1995) e também inibe o NF- κ B *in vivo* (FATTORI et al., 2015). A supressão desse fator de transcrição nuclear pró-inflamatório pela curcumina resulta na redução da expressão gênica de múltiplos mediadores inflamatórios como as citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12, as enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), lipooxigenase (LOX) e moléculas de adesão. A inibição da expressão de COX-2 diminui a produção das prostaglandinas (PG) E2, PGF2- α e PGD2 a partir do ácido araquidônico (BELKACEMI et al., 2011; HATCHER et al., 2008).

Além do NF- κ B, a curcumina também suprime a ativação de outros fatores de transcrição pró-inflamatórios como o Activator Protein-1 (AP-1) e Signal-transducer-and-activator-of-transcription-1, 3, 4 e 5 (STAT1, STAT 3, STAT4 e STAT5) (SHISHODIA, 2013). Os efeitos antiinflamatórios da curcumina também se devem a ativação do receptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR- γ), que é conhecido por inibir a ativação do NF- κ B. O aumento da atividade do PPAR- γ pela curcumina foi demonstrado em astrócitos em cultura com os peptídeos A β_{25-35} , resultando em inibição de vias

pró-inflamatórias ativadas por esses peptídeos (WANG et al., 2010). Devido à capacidade de afetar múltiplos alvos farmacológicos, a curcumina poderia potencialmente prevenir e tratar muitas doenças como o câncer, alergias, aterosclerose, envelhecimento, doenças neurodegenerativas, problemas hepáticos, obesidade, diabetes, doenças autoimunes e inflamatórias (SHISHODIA, 2013).

Evidências crescentes de estudos pré-clínicos demonstram efeitos neuroprotetores da curcumina em modelos animais de DA. O tratamento por três semanas com curcumina (80 mg/kg, p.o.) melhorou os déficits cognitivos na esQUIVA passiva e labirinto aquático de Morris, reduziu o estresse oxidativo e a neurodegeneração induzidos por STZ-ICV em ratos Wistar. Observou-se também o aumento da atividade da enzima ChAT no hipocampo dos animais (ISHRAT et al., 2009). Em outro estudo, verificou-se que a curcumina de forma dose-dependente aumentou o fluxo sanguíneo cerebral, melhorou o prejuízo cognitivo na esQUIVA passiva e labirinto aquático de Morris e reduziu o estresse oxidativo induzido por STZ-ICV em camundongos. Estes efeitos da curcumina se deram em regime de tratamento preventivo e terapêutico (AWASTHI et al., 2010). Além de melhorar a cognição e exercer atividade antioxidante no modelo STZ-ICV, tanto o pré quanto o pós tratamento com curcumina reduziram a atividade da enzima AChE e elevaram os níveis proteicos do receptor de insulina no hipocampo e córtex cerebral de ratos Sprague–Dawley (AGRAWAL et al., 2010). Além dos efeitos neuroprotetores em modelos de DA, a curcumina reduziu a excitotoxicidade mediada por glutamato relacionada ao aumento da produção de BDNF em neurônios corticais de ratos (WANG et al., 2008). Também melhorou os déficits cognitivos de camundongos idosos por aumento da atividade e expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (YU et al., 2013).

Muitos estudos pré-clínicos recentes apontam um papel importante da curcumina na modulação da expressão de fatores neurotróficos e da neurogênese adulta. Verificou-se que o tratamento crônico com curcumina reverteu a redução nos níveis de BDNF induzida por estresse, além de regularizar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e as alterações comportamentais (XU et al., 2006). A curcumina também reverteu a redução nos níveis de BDNF no modelo animal de depressão induzido por

corticosterona (HUANG et al., 2011), no teste de nado forçado (ZHANG et al., 2012) e em ratos Wistar Kioto adultos que são considerados um modelo não induzido de depressão (HURLEY et al., 2013).

Adicionalmente, a curcumina mostrou muitos efeitos positivos sobre a neurogênese adulta em diversos modelos animais. A curcumina induziu a diferenciação neuronal de CPN e a sinaptogênese em cultura e estimulou a neurogênese *in vivo* através de inibição da histona acetiltransferase (KANG; CHA; JEON, 2006). A curcumina foi capaz de estimular *in vitro* a proliferação de CPN embrionárias obtidas de camundongos e, além disso, a sua administração a camundongos adultos resultou em aumento significativo no número de novos neurônios no GD do hipocampo, indicando que o tratamento com curcumina aumenta a neurogênese hipocampal adulta (KIM et al., 2008). Demonstrou-se que os curcuminóides promovem a neuritogênese e diferenciação neuronal em células PC12 por meio das vias dependentes de MAPK/ERK e proteína kinase C (PKC) (LIAO et al., 2012). Em ratos idosos da linhagem Sprague-Dawley, o tratamento prolongado com curcumina melhorou a cognição e a neurogênese no GD do hipocampo devido aos seus efeitos sobre a expressão de genes envolvidos com o crescimento e plasticidade neuronal (DONG et al., 2012). A curcumina também já foi bastante estudada em modelos animais de depressão devido ao seu uso tradicional na medicina chinesa como antidepressivo. Em modelo de depressão induzido por estresse crônico imprevisível em ratos, a curcumina demonstrou reverter a redução na neurogênese hipocampal e aumentar a expressão do BDNF e do receptor 5-HT_{1A} da serotonina, ambos envolvidos na neurogênese no hipocampo (XU et al., 2007). Uma formulação de curcumina nanoparticulada aumentou a neurogênese hipocampal por estimulação da via canônica wnt/ β -catenin (envolvida na proliferação, diferenciação e sobrevivência das CTN) em modelo de DA induzido por oligômeros A β (TIWARI et al., 2014). Entretanto, os efeitos do tratamento prolongado com curcumina sobre a neurogênese adulta nunca foram estudados no modelo STZ-ICV da DA esporádica. Dessa forma, formulou-se a hipótese de que o tratamento oral crônico com curcumina seria capaz de preservar as funções cognitivas de ratos Wistar lesados com STZ-ICV devido ao estímulo da neurogênese adulta e inibição da neuroinflamação.

2 JUSTIFICATIVA

Existem muitas evidências de que a neuroinflamação, a redução da neurogênese e dos fatores neurotróficos, especialmente o BDNF, estão envolvidos na patogênese e no declínio cognitivo progressivo observados na DA. Por isso, abordagens terapêuticas que tem esses fatores como alvo vem sendo apontadas como possíveis alternativas no tratamento desta doença. A curcumina demonstrou em diversos estudos ser benéfica em alguns modelos animais de DA e em animais idosos ao melhorar o prejuízo cognitivo. Paralelamente, verificou-se que a curcumina estimula a neurogênese no cérebro adulto em modelos de estresse, depressão e envelhecimento, eleva os níveis de BDNF em situações fisiológicas e patológicas e reduz a neuroinflamação. Entretanto, não se sabe se a curcumina apresenta estes efeitos no modelo induzido por STZ-ICV em ratos. Dessa forma, é relevante investigar se o tratamento com curcumina é capaz de prevenir o declínio cognitivo, associado ao estímulo da neurogênese adulta e inibição do processo inflamatório no modelo induzido por STZ-ICV da DA esporádica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a relação entre a neuroinflamação, as disfunções na neurogênese adulta e o consequente prejuízo na memória espacial de curto e longo prazo no modelo de doença de Alzheimer esporádica induzido por injeção ICV de STZ em ratos Wistar. Além disso, estudar os efeitos do tratamento prolongado com curcumina sobre as funções cognitivas, a neurogênese adulta e a neuroinflamação no mesmo modelo.

3.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da injeção ICV de STZ sobre a memória espacial de curta duração nos testes de localização de objetos e labirinto em Y, e sobre a memória espacial de longa duração no condicionamento de medo ao contexto;

- Estudar os efeitos da injeção ICV de STZ sobre a locomoção espontânea e o comportamento tipo-ansioso nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado, respectivamente;
- Estudar a influência da microgliose e astrogliose reativas sobre a proliferação das CTN e CPN e sobre o número de neurônios imaturos no GD e ZSV de ratos submetidos à infusão de STZ-ICV através de imunohistoquímica para os marcadores Iba-1 (microglia), GFAP (astrócitos), Ki-67 (marcador de proliferação celular) e DCX (neuroblastos e neurônios imaturos);
- Avaliar os efeitos da injeção ICV de STZ sobre a maturação e sobrevivência dos novos neurônios através da injeção de BrdU nos animais antes da cirurgia e imunohistoquímica com dupla marcação para BrdU e NeuN (marcador de neurônios maduros) 30 dias após a cirurgia;
- Dosar os níveis proteicos do fator neurotrófico BDNF e da citocina pró-inflamatória TNF- α no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos à infusão de STZ-ICV através de western blotting e Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), respectivamente.
- Avaliar os efeitos da curcumina sobre o prejuízo cognitivo induzido pela injeção ICV de STZ através dos testes de localização de objetos, reconhecimento de objetos e labirinto em Y;
- Avaliar os efeitos da STZ e da curcumina sobre a glicemia dos animais;
- Avaliar os efeitos da curcumina sobre a neurogênese adulta no GD do hipocampo e ZSV nos animais submetidos à infusão de STZ-ICV através de imunohistoquímica para DCX e Ki-67;
- Avaliar os efeitos da curcumina sobre a neuroinflamação através de imunohistoquímica para os marcadores gliais GFAP e Iba-1 no GD, áreas CA1 e CA3 do hipocampo e áreas periventriculares nos ratos submetidos à infusão de STZ-ICV.

4 MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos, de 3-4 meses de idade, pesando 300-340 g no início dos experimentos, provenientes do Biotério

Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram mantidos em uma sala com umidade e temperatura controladas ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), em um ciclo claro-escuro de 12 horas (7h00-19h00), com a fase clara iniciando às 7h. Água e comida (ração comercial para roedores) foram fornecidas à vontade aos animais durante todos os experimentos. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFPR com o número de protocolo 735.

4.2 DROGAS

Estreptozotocina (STZ – Santa Cruz Biotechnology – Santa Cruz, CA, EUA);
5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU – Sigma-Aldrich – St. Louis, MO, EUA);
Curcumina (da *Curcuma longa*, Linn. - Sigma-Aldrich – St. Louis, MO, EUA).

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos 1 e 2 foram conduzidos para caracterização e estudo do modelo animal de DA induzido por STZ-ICV em ratos Wistar até então novo em nosso departamento. O objetivo foi avaliar a influência da injeção ICV de STZ sobre a neuroinflamação (astroglíose, microglíose e níveis de $\text{TNF-}\alpha$), a proliferação, diferenciação, maturação e sobrevivência dos novos neurônios e as suas consequências na memória espacial dos animais. O experimento 3 teve como objetivo estudar os efeitos do tratamento crônico com curcumina sobre a memória espacial e de reconhecimento de curto prazo, a neurogênese adulta e a neuroinflamação no modelo induzido por STZ-ICV.

Experimento 1

Os animais foram divididos em grupo sham e STZ. O grupo lesado recebeu injeção bilateral de STZ (3 mg/kg, total de 0,9 mg, dissolvida em solução salina estéril) nos ventrículos laterais e o grupo sham recebeu somente solução salina estéril. Sete dias após a cirurgia, um subconjunto de animais ($n = 5$ por grupo) foi eutanasiado por perfusão cardíaca para o estudo da proliferação celular (Ki-67), microglíose (Iba-1) e astroglíose (GFAP) reativas por imunohistoquímica (IHQ). Outro subconjunto de animais ($n = 6$ por grupo)

foi eutanasiado e os cérebros dissecados para dosagem de BDNF e TNF- α no hipocampo e córtex pré-frontal (CPF). O restante dos animais ($n = 6-9$ por grupo) foi avaliado em testes comportamentais. No dia 21 após a cirurgia, passaram pelo campo aberto, no dia 22 pelo labirinto em cruz elevado, no dia 28 pela habituação à caixa de objetos, no dia 29 pelo teste de localização de objetos e no dia 30 pelo labirinto em Y. Depois dos testes comportamentais, a glicemia foi medida no sangue da veia da cauda com tiras de glicose e o aparelho G-Tech Free e em seguida os animais foram profundamente anestesiados, perfundidos transcordialmente e os cérebros foram removidos e processados para IHQ para DCX (neurônios imaturos), Iba-1 e GFAP (FIGURA 4).

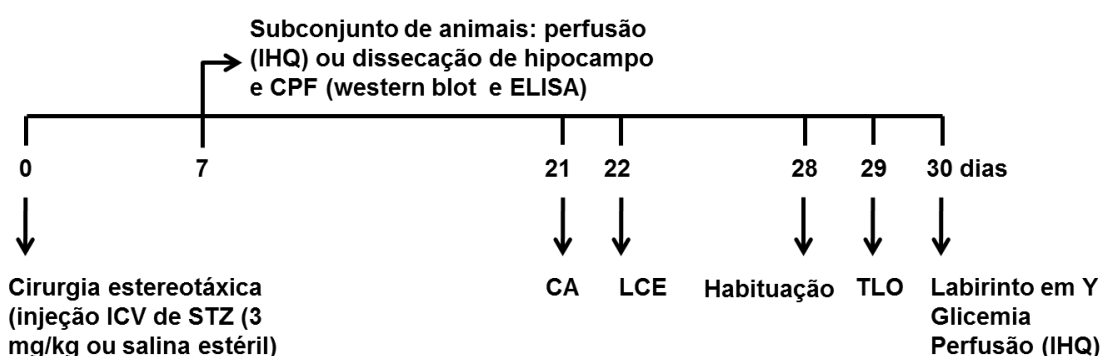


FIGURA 4 - EXPERIMENTO 1. Avaliação da influência da injeção ICV de STZ na neuroinflamação aguda e na proliferação das CTN/CPN aos 7 dias após a cirurgia, e avaliação dos seus efeitos na neurogênese e memória espacial de curto prazo aos 30 dias após a cirurgia. IHQ, imunohistoquímica; CPF, córtex pré-frontal; CA, campo aberto; LCE, labirinto em cruz elevado; TLO, teste de localização de objetos.

Experimento 2

Para avaliar os efeitos da STZ-ICV na sobrevivência e maturação dos novos neurônios, os animais receberam quatro injeções de 50 mg/kg, i.p., de BrdU, totalizando 200 mg/kg (TAUPIN, 2007). Duas injeções foram aplicadas dois dias antes da cirurgia, separadas por 2 h de intervalo, e as outras duas injeções foram aplicadas um dia antes da cirurgia, separadas por 2 h de intervalo. O BrdU foi dissolvido em solução salina estéril em banho maria a 37°C por 30 min e administrado no volume final de 3 mL/kg. O BrdU é um análogo sintético da timidina que é incorporado ao DNA das células em replicação durante a fase S do ciclo celular. Pode funcionar como um marcador de proliferação ou sobrevivência de acordo com o intervalo de tempo entre a sua administração e a perfusão dos animais (TAUPIN, 2007). Os animais então

foram divididos em grupo sham e STZ. O grupo lesado recebeu injeção bilateral de STZ (3 mg/kg, dissolvida em solução salina estéril) nos ventrículos laterais e o grupo sham recebeu somente solução salina estéril. No dia 29 após a cirurgia, os animais foram treinados na caixa de condicionamento de medo ao contexto (CMC) e no dia 30 passaram pelo teste de CMC para avaliação da memória espacial de longa duração. Depois do comportamento, os animais foram profundamente anestesiados, perfundidos transcardialmente e os cérebros foram removidos e processados para IHQ para BrdU (marcador de sobrevivência) e NeuN (marcador de neurônios maduros) (FIGURA 5).



FIGURA 5 - EXPERIMENTO 2. Avaliação dos efeitos da STZ-ICV na sobrevivência e diferenciação/maturação de novos neurônios e na memória espacial de longa duração. BrdU, bromodeoxiuridina; IHC, imunohistoquímica; CMC, condicionamento de medo ao contexto.

Experimento 3

Foi realizada uma curva dose-resposta para avaliar os efeitos do tratamento crônico com curcumina em animais lesados com STZ-ICV sobre as funções cognitivas, neurogênese e neuroinflamação. Os animais foram divididos em grupo sham e STZ. O grupo lesado recebeu injeção bilateral de STZ (3 mg/kg, dissolvida em solução salina estéril) nos ventrículos laterais e o grupo sham recebeu somente solução salina estéril. A curcumina foi administrada aos animais durante 30 dias por gavagem (per os – p.o.), iniciando 1h antes da cirurgia estereotáxica e utilizando como veículo a carboximetilcelulose 0,5% em água destilada com 1% de Tween 80. As doses de curcumina testadas (25, 50 e 100 mg/kg) estão dentro da faixa de doses descritas na literatura (5 – 300 mg/kg) (AGRAWAL et al., 2010; AWASTHI et al., 2010; HURLEY et al., 2013; ISHRAT et al., 2009; ISIK et al., 2009; TIWARI et al., 2014). No dia 21 após a cirurgia, os animais foram testados no campo aberto, no dia 22 no labirinto em cruz elevado, no dia 27 foi feita habituação à caixa de objetos, no dia 28 o teste de localização de objetos, no dia 29 o teste

WATSON (1997). Através de uma perfuração no crânio, a microinfusão foi realizada com o auxílio de uma agulha (30 gauge) conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma micro seringa de 10 µl (Hamilton, EUA) que foi encaixada em uma bomba de infusão (Insight, Brasil). Os grupos lesados receberam injeção bilateral de STZ nos ventrículos laterais (3 mg/kg de peso corporal em solução salina estéril; total de 0,9 mg de STZ em 9 µL, divididos em 4,5 µl por local de injeção) (ISHRAT et al., 2009; KRASKA et al., 2012). Os grupos sham passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, porém o mesmo volume de solução salina estéril foi injetado nos ventrículos. As microinfusões de toxina ou veículo foram realizadas com fluxo de 1 µl/min ao longo de 4,5 min. A STZ foi dissolvida em solução salina estéril e gelada, protegida da luz e mantida em gelo até o momento da infusão para evitar a sua degradação. Todos os ratos receberam Pentabiótico (0,1 ml, intramuscular) para prevenir infecções. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas em ambiente aquecido e ventilado por 2-4 h para recuperação da anestesia e posteriormente foram encaminhados à sala de manutenção. Durante 10-15 dias após a cirurgia, os animais receberam água e comida dentro da caixa para facilitar a alimentação e evitar traumas na cabeça.

4.5 TESTE DO CAMPO ABERTO (CA)

O teste do campo aberto foi realizado para avaliar a atividade locomotora e exploratória espontânea dos animais. O aparato utilizado consiste em uma arena circular com 97 cm de diâmetro e 42 cm de altura, pintada em branco, dividida com linha pretas em 19 quadrantes e 3 círculos concêntricos. O ambiente foi moderadamente iluminado na intensidade de 20 lux. Os animais foram individualmente colocados no centro do campo aberto e seu comportamento foi monitorado durante 5 minutos. No experimento 1, os seguintes parâmetros foram avaliados: número total de cruzamentos (número total de quadrantes percorridos) e frequência de levantar (quando o animal se apoia somente sobre as patas traseiras, com o tronco perpendicular ao chão da arena). No experimento 3, o comportamento dos animais foi filmado para posterior análise com o auxílio de uma câmera posicionada sobre a arena e os

seguintes parâmetros foram avaliados: número total de cruzamentos, número de cruzamentos na periferia do aparato, número de cruzamentos nos quadrantes centrais do aparato, tempo gasto na periferia, tempo gasto no centro e frequência de levantar. Um cruzamento foi considerado somente quando o animal encontrou em um quadrante com as quatro patas. Após cada animal, a arena foi limpa com álcool 10% para evitar que o cheiro e resíduos de outros animais influenciassem no comportamento dos próximos.

4.6 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O teste do LCE foi realizado para avaliar o comportamento tipo ansioso dos animais, de acordo com estudos prévios (GRAY et al., 2015; PELLOW et al., 1985). O labirinto foi confeccionado em madeira, pintado de preto, com as seguintes dimensões: dois braços abertos opostos (50 cm x 10 cm) e dois braços fechados opostos (50 cm x 10 cm x 30 cm) que se estendem a partir de um quadrado central (10 cm x 10 cm). O labirinto foi elevado 60 cm do chão e colocado em ambiente moderadamente iluminado (20 lux). Os animais foram colocados individualmente no centro do aparato em direção a um dos braços abertos e o seu comportamento foi filmado durante 5 minutos por uma câmera fixada ao teto e posicionada acima do aparato. Os seguintes parâmetros foram analisados: tempo gasto nos braços abertos; porcentagem de tempo gasto nos braços abertos; tempo nos braços fechados; porcentagem de tempo gasto nos braços fechados; número de entradas nos braços abertos; número de entradas nos braços fechados; total de entradas; mergulho da cabeça (*head dipping* - número de vezes que o animal projeta a cabeça para baixo de um braço aberto) e avaliação de risco (*risk assessment* – número de vezes que o animal projeta somente as patas dianteiras e a cabeça para fora de um braço fechado para observar o ambiente, sem sair do braço fechado). O aparato foi limpo com álcool 10% entre os testes para evitar que o cheiro e resíduos de outros animais influenciassem no comportamento dos próximos.

4.7 TESTE DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS (TLO) E DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (TRO)

Os testes de localização e reconhecimento de objetos foram realizados para avaliação da memória espacial e de reconhecimento de curto prazo, respectivamente. Ambos os testes foram executados em uma caixa quadrada (100 x 100 x 40 cm), confeccionada em madeira, pintada de preto e posicionada em ambiente com luz moderada (20 lux). Uma câmera foi posicionada sobre a arena a fim de filmar o comportamento dos animais para posterior avaliação. No experimento 1, foi realizado apenas o TLO, no experimento 3 foram realizados o TLO e o TRO. A primeira etapa consistiu em habituação dos animais à caixa. Cada animal foi colocado na caixa vazia durante 5 min para livre exploração. Uma nova sessão de habituação de 5 min foi realizada 24 h depois. Após 1 h de intervalo, na sessão treino, 2 objetos idênticos foram posicionados de forma simétrica no aparato, com aproximadamente 10 cm de distância das paredes. Os animais puderam explorar os objetos durante 5 min e então foram retornados para suas caixas moradia. No TLO, após 1 h de intervalo, durante a sessão teste, cada rato foi colocado novamente na caixa com um dos objetos movido 15 cm em relação à posição original (nova localização); os animais puderam explorar os objetos durante 3 min e então retornaram as caixas moradia (DE BRUIN et al., 2011).

Para o experimento 3, no dia seguinte (dia 29) foi realizado o TRO, porém não foi feita nova habituação à caixa. Uma nova sessão treino de 5 min foi realizada com outros 2 objetos idênticos dispostos em posição simétrica, aproximadamente 10 cm de distância das paredes da caixa. Após 1 h de intervalo, na sessão teste, um dos objetos foi mantido (objeto familiar), o outro foi substituído por um objeto diferente (objeto novo) e ambos permaneceram nas posições originais. Cada animal foi colocado novamente na arena durante 3 minutos para exploração dos objetos (DE BRUIN et al., 2011).

Os objetos eram confeccionados em plástico, vidro ou cerâmica. A fim de evitar viés olfatório, antes de cada sessão e entre cada animal, os objetos e a caixa foram limpos com pano molhado com álcool 10%. Todos os objetos e localizações foram equilibrados aleatoriamente para reduzir viés de preferência por lugar ou objetos específicos. Os objetos eram pesados o suficiente para que um animal não conseguisse movê-los. Todos os animais foram colocados na arena sempre voltados para a mesma parede em todas as sessões (DE BRUIN et al., 2011). A exploração dos objetos foi contabilizada com auxílio de

cronômetros manuais e foi considerada somente quando o animal cheirasse um objeto a uma distância menor que 2 cm ou tocasse o objeto com o focinho. Sentar-se, apoiar-se ou andar ao redor dos objetos não foi considerado comportamento exploratório (MELLO-CARPES; IZQUIERDO, 2013).

As medidas contabilizadas para ambos os testes foram o tempo total gasto por cada animal explorando cada objeto durante a sessão teste. O tempo gasto pelo animal explorando o objeto familiar (TRO) ou localização familiar (TLO) e o objeto novo (TRO) ou localização nova (TLO) foram representados por 'a' e 'b', respectivamente. As seguintes variáveis foram calculadas: $e = a + b$; e $d = (b - a)/e$. A variável 'e' é a soma do tempo total de exploração de ambos os objetos durante a sessão teste; e 'd' é considerado um índice de discriminação entre o novo e o familiar (objetos ou posições). Considera-se 'd' como uma medida relativa de discriminação que corrige a atividade exploratória do animal (e; DE BRUIN et al., 2011).

4.8 TESTE DO LABIRINTO EM Y – VERSÃO ESPACIAL

Nesse teste foi utilizado um aparato no formato da letra Y, confeccionado em madeira e pintado de preto, com três braços separados por ângulos de 120°, medindo 50 cm de comprimento, 12 cm de largura e 27 cm de altura. O aparato foi colocado em ambiente com luz moderada (20 lux) e o comportamento dos animais foi filmado para posterior avaliação com uma câmera posicionada sobre o aparato. A versão espacial deste teste (que foi realizada no dia 30 após a cirurgia nos experimentos 1 e 3) consiste em uma sessão treino e uma sessão teste com 1 h de intervalo entre elas. Na sessão treino, um dos braços ficou inacessível por uma porta de madeira colocada em frente a ele. Os animais foram colocados em um dos outros dois braços (chamado de 'braço inicial', que foi randomizado entre os grupos) e puderam explorar esses braços do labirinto durante 5 min. O animal foi removido e retornado à sua caixa moradia. A porta de madeira foi removida, permitindo acesso aos três braços do labirinto; o braço previamente bloqueado foi chamado de "braço novo". Após o intervalo de 1 h, na sessão teste, os animais foram colocados novamente no respectivo braço inicial e puderam explorar

livremente o labirinto durante 3 min. A memória espacial de curto prazo foi avaliada pelo tempo gasto por cada animal explorando o braço novo do labirinto, o qual deveria ser significativamente maior que 33,3% do total, corrigido pela latência para sair do braço inicial e o tempo gasto no centro do aparato. Uma entrada em um braço requer que todas as patas do animal estejam dentro do braço. O labirinto foi limpo com álcool 10% entre cada sessão e cada animal para reduzir o viés olfatório (SIERKSMA et al., 2013).

4.9 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO

O teste de condicionamento de medo ao contexto foi empregado para avaliar a memória espacial de longo prazo de acordo com o método de CARLINI; MENDES (2011). O teste consistiu em uma sessão treino e, 24 h depois, uma sessão teste. Ambas ocorreram no mesmo ambiente e na mesma caixa de condicionamento, que foi confeccionada em acrílico (22 cm x 21 cm x 22 cm), com um plástico transparente na parte frontal e o piso feito de barras paralelas de aço inoxidável de 5 mm de diâmetro, espaçadas 15 mm uma da outra. A caixa foi acoplada a um gerador de choque. Na sessão treino, cada animal foi colocado individualmente na caixa e, após 2 min de habituação, foi disparada uma sequência de três choques elétricos nas patas de 0,7 mA, de 2 segundos de duração e separados por intervalos de 30 segundos. Cada animal foi mantido na caixa por mais um minuto e então retornado à sua caixa moradia. Na sessão teste, 24 h depois do treino, cada animal foi colocado individualmente na caixa de condicionamento, mas nenhum choque foi liberado. Uma câmera frontal foi posicionada para filmar o teste para posterior análise comportamental. A evocação da memória espacial de longa duração foi medida na sessão teste pelo tempo total de congelamento (freezing) do animal, definido como a completa imobilidade do corpo do animal e ausência de movimentos das vibrissas e focinho. O tempo de congelamento foi medido manualmente com cronômetro a cada minuto durante 5 min e foi expresso em porcentagem do tempo total. A caixa de condicionamento foi limpa com álcool 10% entre cada animal e sessão para reduzir o viés olfatório.

4.10 IMUNOHISTOQUÍMICA

Após os testes comportamentais, 30 dias depois das cirurgias, os animais foram profundamente anestesiados com uma alta dose de hidrato de cloral e perfundidos transcardialmente com auxílio de uma bomba peristáltica (Insight, Brasil) com aproximadamente 150 mL de PBS (phosphate-buffered saline) 0,01 M, pH 7,40, seguido por aproximadamente 150 mL de solução fixadora de paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M, pH 7,40, ambos gelados. Os cérebros foram removidos do crânio, mantidos em paraformaldeído 4% por 24 h a 4° C e crioprotégidos por imersão em solução de sacarose 30% em PBS 0,1 M, pH 7,40 a 4° C por 4 dias. Os cérebros passaram pelo procedimento de congelamento rápido com gelo seco e etanol absoluto e foram armazenados em freezer a -80° C até o seccionamento.

O tecido congelado foi seccionado em cortes coronais semi-seriados de 30 µm de espessura ao longo dos ventrículos laterais e do hipocampo dorsal em um criostato (Leica Biosystems, Nusslock, Alemanha). Para os ventrículos laterais, os cortes foram coletados em 8 poços ao longo das seguintes coordenadas estereotáticas relativo ao bregma: +1.00 a -0.92 mm (PAXINOS; WATSON, 1997), totalizando 8-10 cortes por poço, com 240 µm de espaçamento. Para o hipocampo dorsal, os cortes foram coletados em 8 poços ao longo das seguintes coordenadas estereotáticas relativo ao bregma: -2.56 a -4.52 mm (PAXINOS; WATSON, 1997), totalizando 8-10 cortes por poço, com 240 µm de espaçamento. As secções de cérebro foram estocadas a -20° C em solução crioprotetora contendo 30% de etilenoglicol e 15% de sacarose em tampão fosfato 0,05 M até o processamento. Todos os cortes de cada poço foram utilizados em uma reação de imunohistoquímica.

Reações de imunohistoquímica free floating para os marcadores Ki-67, DCX, GFAP, Iba-1, foram realizadas com um passo inicial de recuperação antigênica. Brevemente, as secções de cérebro foram lavadas com tampão A (PBS 0,1 M pH 7,4 com 0,5% de Triton X-100), incubadas em tampão citrato 0,1 M pH 6,0 em banho-maria a 50° C por 30 min. Depois de resfriadas a temperatura ambiente, foram lavadas com tampão A, incubadas com solução a 0,5% de H₂O₂ em PBS 0,1 M por 30 min a temperatura ambiente e protegido da

luz, lavadas novamente com tampão A e incubadas com albumina de soro bovino (BSA) a 2% em tampão A (tampão de bloqueio) a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente, os cortes de cérebro foram incubados overnight a 4° C com os seguintes anticorpos primários diluídos em tampão de bloqueio: rabbit polyclonal anti-Ki-67 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), goat polyclonal anti-DCX (1:300, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), rabbit polyclonal anti-GFAP (1:500, Dako, CA, EUA), goat polyclonal anti-Iba-1 (1:500, Abcam, Cambridge, MA, EUA).

No dia seguinte, os cortes foram lavados em tampão A e incubados com os respectivos anticorpos secundários biotinilados (anti-rabbit e anti-goat), diluídos em tampão de bloqueio, por 2 h a 4° C. Os cortes foram lavados em tampão A e incubados com reagente ABC (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) em PBS 0,1 M por 2 h a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS 0,1 M, a reação foi revelada por incubação dos cortes com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) em PBS 0,1 M a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS 0,1 M, montados em lâminas gelatinizadas e deixados secar ao ar livre. Os cortes do hipocampo dorsal marcados pelo Ki-67 foram corados com coloração de Nissl (ver item 4.11) para facilitar a visualização da ZSG do GD. Os cortes dos outros marcadores foram desidratados em soluções de concentração crescente de etanol, clarificados em xilol e selados com lamínula e Entellan (Merck, Alemanha).

As áreas peri-ventriculares (estriado adjacente ao ventrículo lateral, septo e corpo caloso) foram fotografadas em microscópio óptico (Olympus Optical, BX50, Center Valley, PA, EUA) sob o aumento de 200 x. A imunorreatividade para DCX, Ki-67, GFAP e Iba-1 foi quantificada por densidade óptica, usando o software Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA) e os resultados foram expressos como imunorreatividade para cada marcador em porcentagem do grupo sham. As células Ki-67- e DCX-positivas foram contadas manualmente na ZSG do GD do hipocampo dorsal em um microscópio óptico (Olympus Optical, BX50, Center Valley, PA, EUA) sob o aumento de 400 x.

Nas amostras do experimento 1, as células GFAP- e Iba-1-positivas no GD e nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo dorsal foram fotografadas em

microscópio óptico sob o aumento de 200 x e manualmente contadas usando o software Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA). O marcador Iba-1 é expresso tanto na micróglia ativada (reativa) quanto em repouso. Assim, uma avaliação quantitativa da morfologia microglial foi realizada, classificando as células em reativas ou em repouso de acordo com critérios morfológicos pré-estabelecidos (GOMES et al., 2015). Nas amostras do experimento 3, o GD e as áreas CA1 e CA3 do hipocampo dorsal foram fotografadas em microscópio óptico (Olympus Optical, BX50, Center Valley, PA, EUA) sob o aumento de 200 x. A imunorreatividade para GFAP e Iba-1 foi quantificada por densidade óptica, usando o software Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA) e os resultados foram expressos como porcentagem de células imunorreativas para cada marcador relativo ao grupo sham.

Os efeitos da STZ sobre a diferenciação, maturação e sobrevivência de novos neurônios foram estudados através de administração de BrdU antes da injeção de STZ e, 30 dias depois, perfusão dos animais e imunohistoquímica com dupla marcação fluorescente para os marcadores BrdU (marcador de sobrevivência) e NeuN (marcador de neurônios maduros) no GD do hipocampo dorsal. Os cortes do hipocampo dorsal foram lavados em tampão TBS (Tris-buffered saline) 0,1 M, incubados em solução de HCl 2M por 30 min a 37°C para desnaturação do DNA e neutralizados com tampão borato 0,1 M (pH 8,9). Depois disso, os cortes foram lavados em TBS e incubados com tampão de bloqueio contendo BSA 2% em TBS 0,1 M por 2 h a temperatura ambiente. Os cortes foram incubados overnight a 4°C ao mesmo tempo com os seguintes anticorpos primários: mouse monoclonal anti-BrdU (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e rabbit monoclonal anti-NeuN (1:500; Abcam, Cambridge, MA, USA) em TBS 0,1 M contendo 0,3% de Triton X-100 overnight a 4°C. No dia seguinte, os cortes foram lavados em TBS e incubados por 2 h a 4°C ao mesmo tempo com os seguintes anticorpos secundários fluorescentes: Alexa Fluor 488 (fluorescência verde) goat anti-mouse (1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e Alexa Fluor 546 (fluorescência vermelha) donkey anti-rabbit (1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Os cortes de cérebro foram montados em lâminas de microscopia gelatinizadas, cobertos com glicerol e lamínula e guardados em geladeira protegidos da luz até a análise.

As imagens do GD do hipocampo foram capturadas em microscópio confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tóquio, Japão) sob o aumento de 200x. As células com dupla marcação para BrdU e NeuN (fluorescência amarela) foram manualmente contadas na ZSG e CCG do GD do hipocampo com auxílio do software Image J Fiji (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA).

4.11 COLORAÇÃO DE NISSL COM CORANTE TIONINA

Os cortes do hipocampo dorsal marcados pelo Ki-67 foram corados com coloração de Nissl para facilitar a visualização da ZSG do GD. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e deixados secar ao ar livre. As lâminas foram submetidas a um gradiente de concentração crescente de álcool etílico, clarificadas em xilol, depois rehidratadas em concentração decrescente de álcool etílico e coradas com o corante tionina (0,25%). Depois disso, foram novamente desidratadas em concentração crescente de álcool etílico, clarificadas em xilol e, finalmente, montadas com Entellan (Merck, Alemanha) e lamínula. Depois de 24 horas de secagem ao ar livre, o excesso de Entellan foi removido com xilol. As células Ki-67-positivas do giro denteado do hipocampo dorsal foram contadas em microscópio óptico (Olympus Optical, BX50, Center Valley, PA, EUA) sob o aumento de 400 x.

4.12 WESTERN BLOT PARA QUANTIFICAÇÃO DE BDNF

No experimento 1, sete dias após a cirurgia, 6 animais por grupo foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p.) e decapitados para dissecação do córtex pré-frontal e hipocampo. As estruturas foram rapidamente dissecadas em gelo seco e depois estocadas a -80° C até o processamento. As amostras foram homogeneizadas e sonicadas em tampão de lise (NaCl 50 mM, Hepes 50 mM, ácido etilenodioxidiaminotetracético (EDTA) 2 mM, Triton X-100 1%, complementado com inibidores de protease livres de EDTA (Roche, Alemanha)). As amostras foram mantidas em gelo, centrifugadas a 12000 x g por 10 min a 4° C e então o sobrenadante foi separado e utilizado para determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford (Bio-Rad, Alemanha). O sobrenadante foi submetido à eletroforese em gel de

poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para separação das proteínas por peso molecular. Um gel com gradiente de poliacrilamida (12 e 18%) foi empregado para separação adequada das proteínas. As proteínas separadas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE healthcare, Brasil) através de um Trans-Blot cell system (Bio-Rad) e incubadas em solução de bloqueio (5% de leite desnatado em TBS com 1% de Triton X-100 (TBS-T)) por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas overnight com os seguintes anticorpos primários: rabbit anti-BDNF (1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e rabbit anti- β -Actina (1:1000, Sigma, St. Louis, MO, EUA). Este último foi usado como controle em todos os géis. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com horseradish peroxidase (HRP) diluído em solução de bloqueio por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas em TBS-T e o imunocomplexo foi detectado com um kit de eletroquimioluminescência (GE Healthcare, Brasil). As bandas de BDNF maduro (14 kDA) e β -actina (42 kDA) foram quantificadas por densitometria óptica usando o software Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA) e o resultado foi expresso como porcentagem do grupo sham.

4.13 QUANTIFICAÇÃO DE TNF- α POR ELISA

Os homogenatos de hipocampo e córtex pré-frontal que foram utilizados no western blot também foram usados para a quantificação por ELISA. A quantificação dos níveis de TNF- α no hipocampo e córtex pré-frontal foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (USCN Business Co., Wuhan, Hubei, China). Os ensaios de ELISA foram medidos em leitor de microplacas a 450 nm e os resultados foram expressos como pg/mg de proteínas totais.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o software Graph-Pad Prism 6. A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov–Smirnov e a homogeneidade da variância pelo teste de Bartlett. As diferenças entre os grupos foram avaliadas usando teste *t* de Student bicaudal não pareado para os experimentos 1 e 2 de caracterização do modelo animal; e análise de variância (ANOVA) de uma via com o teste de comparações múltiplas de Tukey para o experimento de tratamento com curcumina. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 PARTE 1 - RESULTADOS REFERENTES AOS EXPERIMENTOS 1 E 2

5.1.1 Caracterização comportamental geral do modelo STZ-ICV

O teste do campo aberto e o LCE foram conduzidos para avaliar a locomoção espontânea e o comportamento tipo ansioso, respectivamente, os quais poderiam interferir no desempenho dos animais nos testes cognitivos, especialmente o TLO e o labirinto em Y. A análise da atividade locomotora espontânea no campo aberto não revelou prejuízos na locomoção no grupo STZ-ICV. Os animais que receberam STZ-ICV exibiram um aumento no número total de cruzamentos (FIGURA 7A) comparado com o grupo sham, mas não houve diferença na frequência de levantar (rearing; FIGURA 7B). No LCE, um aumento no número total de entradas foi observado no grupo STZ comparado com o grupo sham (TABELA 1), o que é também uma indicação de aumento da locomoção. O comportamento tipo ansioso poderia diminuir a exploração de novidades nos TLO e labirinto em Y. Os animais lesados com STZ exibiram redução do comportamento tipo ansioso (i.e., passaram mais tempo nos braços abertos do LCE) comparado com animais sham (TABELA 1). Porém, esse resultado pode refletir um aumento na atividade locomotora no grupo STZ, conforme indicado pelo número total de entradas no LCE.

Além disso, a glicemia elevada é outro fator que poderia interferir no desempenho cognitivo dos animais (ALVAREZ et al., 2009); portanto, os níveis de glicose sanguínea foram medidos após os testes comportamentais, 30 dias depois da cirurgia, para assegurar que os animais não se tornaram diabéticos. Os animais do grupo STZ não apresentaram alterações significativas na glicemia quando comparados com os animais do grupo sham ($p > 0,05$; dados não mostrados).

| TABELA 1 - LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO DOS ANIMAIS DO GRUPO SHAM VS. STZ | | |
|--|---------------|-------------------|
| | Sham | STZ |
| Tempo nos braços abertos (s) | 45.75 ± 5.36 | 126.0 ± 14.92** |
| Tempo nos braços fechados (s) | 176.40 ± 6.15 | 111.80 ± 12.79*** |
| % de tempo nos braços abertos | 15.25 ± 1.79 | 42.00 ± 4.98** |
| % de tempo nos braços fechados | 58.79 ± 2.05 | 37.27 ± 4.26*** |
| Entradas nos braços abertos | 4.67 ± 0.41 | 12.67 ± 1.89*** |
| Entradas nos braços fechados | 14.56 ± 0.67 | 11.50 ± 1.61 |
| Total de entradas | 19.22 ± 0.36 | 24.17 ± 1.14*** |
| Avaliação de risco (risk assessment) | 12.00 ± 1.08 | 8.00 ± 1.13* |
| Mergulho da cabeça (Head Dipping) | 8.78 ± 1.05 | 24.67 ± 3.50** |

Os dados são expressos como média ± EPM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, vs. grupo sham (teste t de Student bicaudal não pareado).

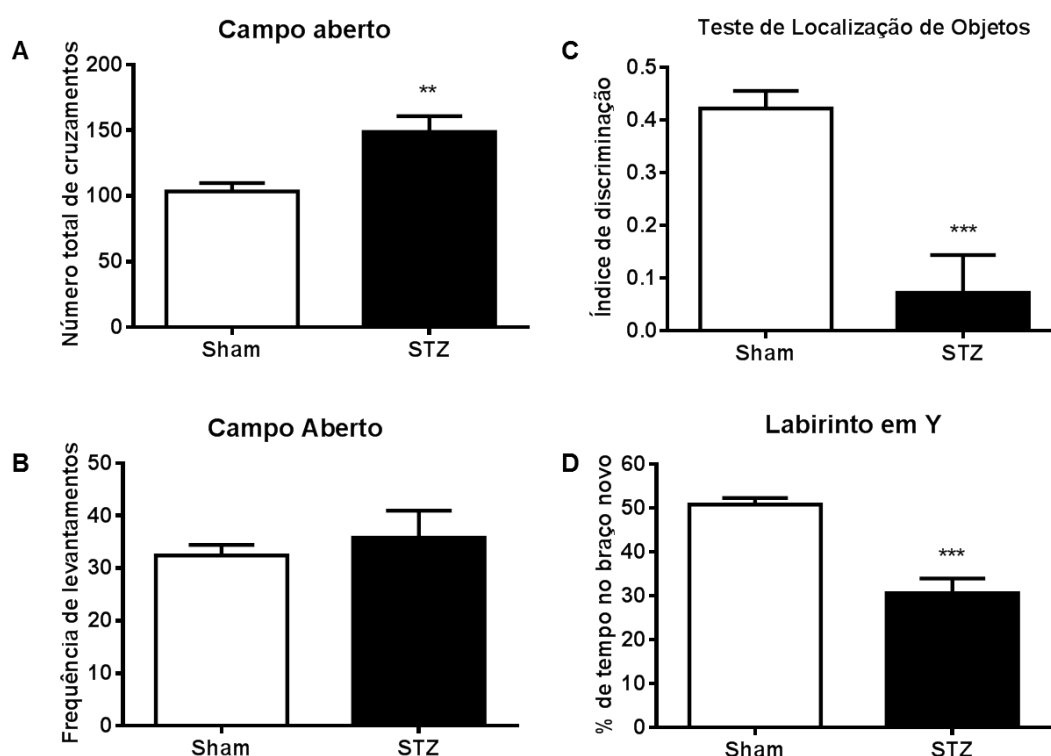


FIGURA 7 - AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS INJETADOS COM STZ-ICV COMPARADOS COM OS ANIMAIS SHAM. A atividade locomotora e exploratória espontânea foi avaliada no teste do campo aberto (A, B). O desempenho cognitivo foi avaliado no teste de localização de objetos (C) e na versão espacial do labirinto em Y (D). Os dados são expressos como média ± EPM. Sham, $n = 9$; STZ, $n = 6$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, vs. grupo sham (teste t de Student bicaudal não pareado).

5.1.2 Uma única injeção ICV bilateral de STZ causou prejuízos cognitivos

Para avaliar a memória espacial de curto prazo, o TLO e o labirinto em Y foram realizados com 1 h de intervalo entre as sessões treino e teste. Os animais lesados com STZ exibiram prejuízos na memória espacial de curto prazo refletidos pela redução no índice de discriminação no TLO (FIGURA 7C) e redução no tempo gasto no braço novo no labirinto em Y (FIGURA 7D) quando comparados com o grupo sham. A memória espacial de longo prazo foi analisada pelo condicionamento de medo ao contexto, com 24 h de intervalo entre as sessões treino e teste. Os animais do grupo STZ exibiram prejuízo na memória espacial de longa duração refletido pela redução na porcentagem de tempo de congelamento (freezing) durante os 5 minutos da sessão teste quando comparados com o grupo sham (TABELA 2).

TABELA 2 - CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO DOS ANIMAIS DO GRUPO SHAM VS. STZ

| % de tempo de congelamento (freezing) | Sham | STZ |
|---------------------------------------|--------------|----------------|
| Primeiro minuto | 45.86 ± 6.68 | 4.12 ± 1.62** |
| Segundo minuto | 79.63 ± 5.61 | 3.15 ± 1.04*** |
| Terceiro minuto | 82.73 ± 4.04 | 1.95 ± 0.98*** |
| Quarto minuto | 83.93 ± 6.84 | 3.19 ± 1.56*** |
| Quinto minuto | 70.64 ± 4.13 | 1.10 ± 0.57*** |

Os dados são expressos como média ± EPM da porcentagem de tempo de congelamento por minuto. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. grupo sham (teste t de Student bicaudal não pareado).

5.1.3 Os animais lesados com STZ apresentaram severa neuroinflamação

A gliose reativa é um importante mecanismo associado com o processo neurodegenerativo (KETTENMANN et al., 2011; SOFRONIEW; VINTERS, 2010). As análises imunohistoquímicas de Iba-1 (FIGURAS 8 e 9) e GFAP (FIGURAS 10 e 11) foram realizadas para avaliar a gliose reativa nos dias 7 e 30 após a cirurgia. Sete dias depois da infusão de STZ-ICV, foi observada intensa ativação microglial, representada por aumento de células Iba-1-positivas hipertróficas no GD e áreas CA1 e CA3 do hipocampo (FIGURAS 8A-C, 9A). Além disso, houve aumento da imunorreatividade para Iba-1 (Iba-1-IR) nas áreas peri-ventriculares (FIGURAS 8G-I, 9B), com a presença de células com morfologia ameboide nos animais do grupo STZ comparados com o grupo sham.

As áreas peri-ventriculares (i.e., ventrículos laterais, septo e corpo caloso) foram escolhidas para estudar os efeitos da STZ próximo ao sítio de injeção. O hipocampo foi analisado devido à possível relação entre a gliose reativa e os prejuízos na neurogênese hipocampal e na memória dependente do hipocampo. O tempo de sete dias após injeção da neurotoxina foi escolhido, pois este é o pico de ativação microglial após uma injúria do SNC (KAWABORI; YENARI, 2014). A imunoreatividade para Iba-1 foi observada em todas as áreas peri-ventriculares no dia 7 depois da infusão de STZ e persistiu até o dia 30 (FIGURAS 8G-I). No hipocampo dorsal, a ativação microglial também foi observada no dia 7 após a cirurgia nos animais do grupo STZ comparados com o grupo sham. O número total de células Iba-1-positivas diminuiu em todas as áreas do hipocampo no dia 7, enquanto o número e a porcentagem de micróglia reativa aumentaram marcadamente (FIGURA 8D-F). No dia 30 depois da injeção de STZ, o número total de células microgliais e de células reativas estava elevado somente na área CA3 (FIGURA 8C), embora a porcentagem de células reativas permaneceu aumentada em todas as áreas hipocâmpais (FIGURA 8D-F).

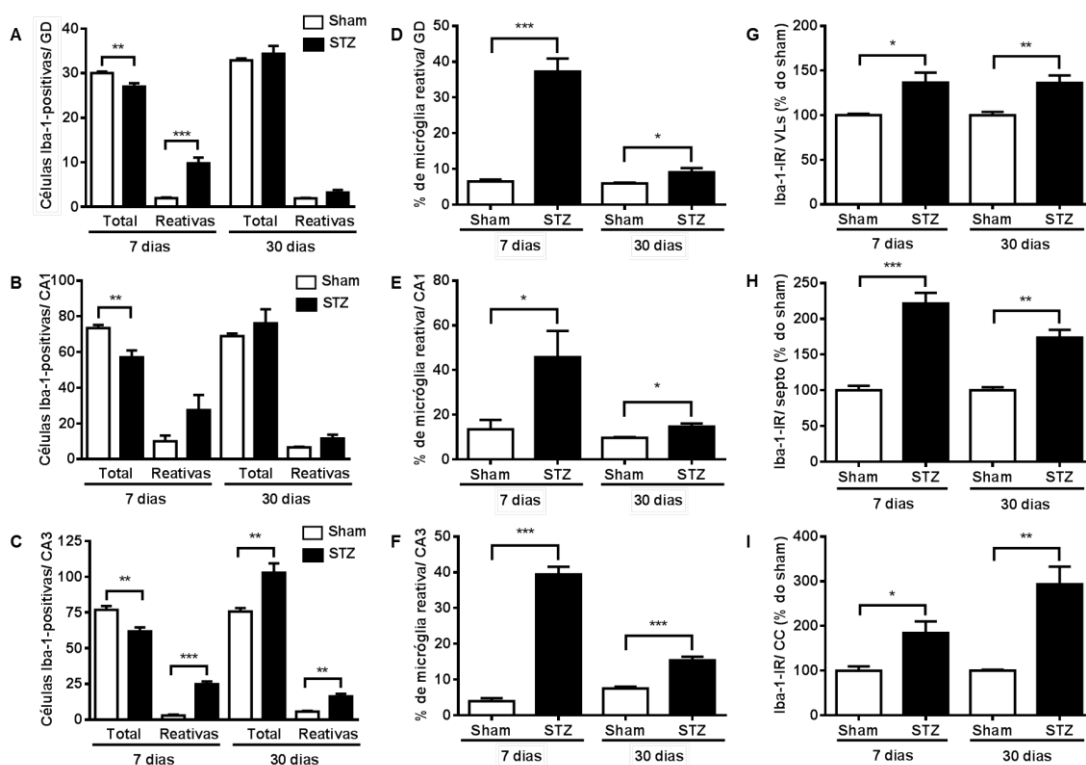
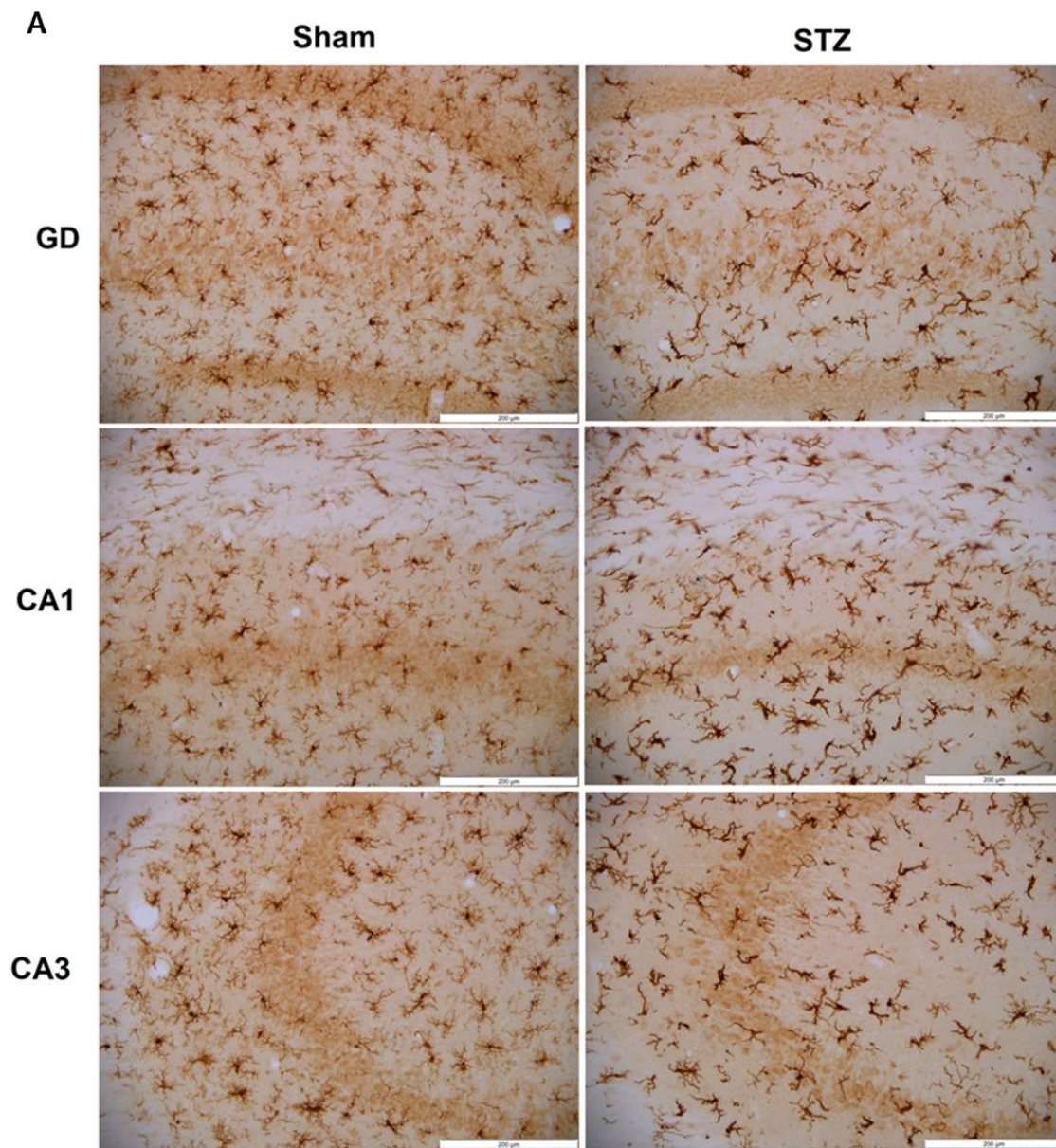


FIGURA 8 - QUANTIFICAÇÃO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL NOS CÉREBROS DE RATOS INJETADOS COM STZ-ICV COMPARADOS COM OS ANIMAIS SHAM, INDICADO PELA IMUNOMARCAÇÃO COM IBA-1. O número e a porcentagem de micróglia reativa aumentaram significativamente no hipocampo (giro denteado (GD), CA1 e CA3) nos animais STZ-ICV,

especialmente aos 7 dias após a cirurgia (A-F). A Imunorreatividade para Iba-1 (Iba-1-IR) aumentou significativamente nas áreas peri-ventriculares (i.e., ventrículos laterais (VLs), septo e corpo caloso (CC)) nos animais STZ-ICV aos 7 e 30 dias após a cirurgia (G-I). Os dados são expressos como média \pm EPM. $n = 5$ por grupo no dia 7; $n = 6$ por grupo no dia 30. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, vs. grupo sham (teste t de Student bicaudal não pareado).



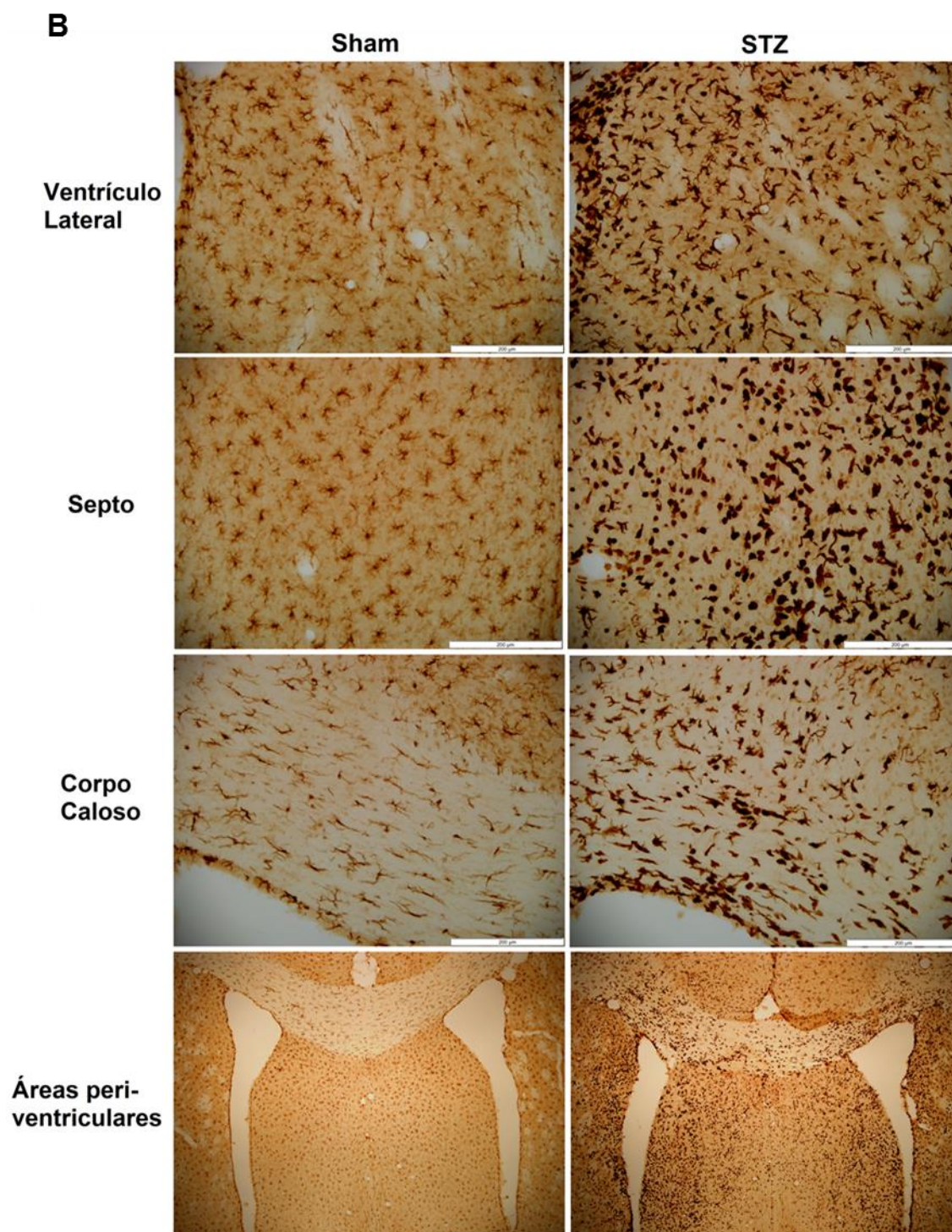


FIGURA 9 - FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS IBA-1-POSITIVAS EM ANIMAIS STZ-ICV E ANIMAIS SHAM. Células Iba-1-positivas no giro denteado (GD) e áreas CA1 e CA3 do hipocampo (A) e nas áreas periventriculares (i.e., ventrículos laterais, septo e corpo caloso – B). Barra da escala = 200 μ m, exceto para áreas peri-ventriculares (barra da escala = 1000 μ m).

A astrogliose, representada pela imunoreatividade para GFAP (GFAP-IR), também foi evidente em todas as áreas peri-ventriculares 7 dias após a cirurgia, persistindo até o dia 30 (FIGURAS 10D-F, 11B), com exceção dos

ventrículos laterais (FIGURA 10D), nos animais lesados com STZ quando comparados com o grupo sham. O padrão de distribuição dos astrócitos se mostrou diferente da micróglia. Os astrócitos estavam localizados mais distantes das paredes dos ventrículos laterais comparados com a micróglia, formando um halo de astrócitos preenchido por células microgliais (FIGURA 11B). No hipocampo dorsal, a astrogliose foi menos intensa, apresentando uma redução no número total de células GFAP-positivas no GD no dia 7 (FIGURA 10A-C, 11A) e um aumento nas células GFAP-positivas na área CA3 somente no dia 30 após a cirurgia (FIGURA 10C) no grupo STZ comparado com o grupo sham. A microgliose e a astrogliose reativas foram acompanhadas por elevação nos níveis de TNF- α no córtex pré-frontal (FIGURA 14C), mas não no hipocampo (FIGURA 14D), no grupo STZ comparado com o grupo sham 7 dias após a cirurgia.

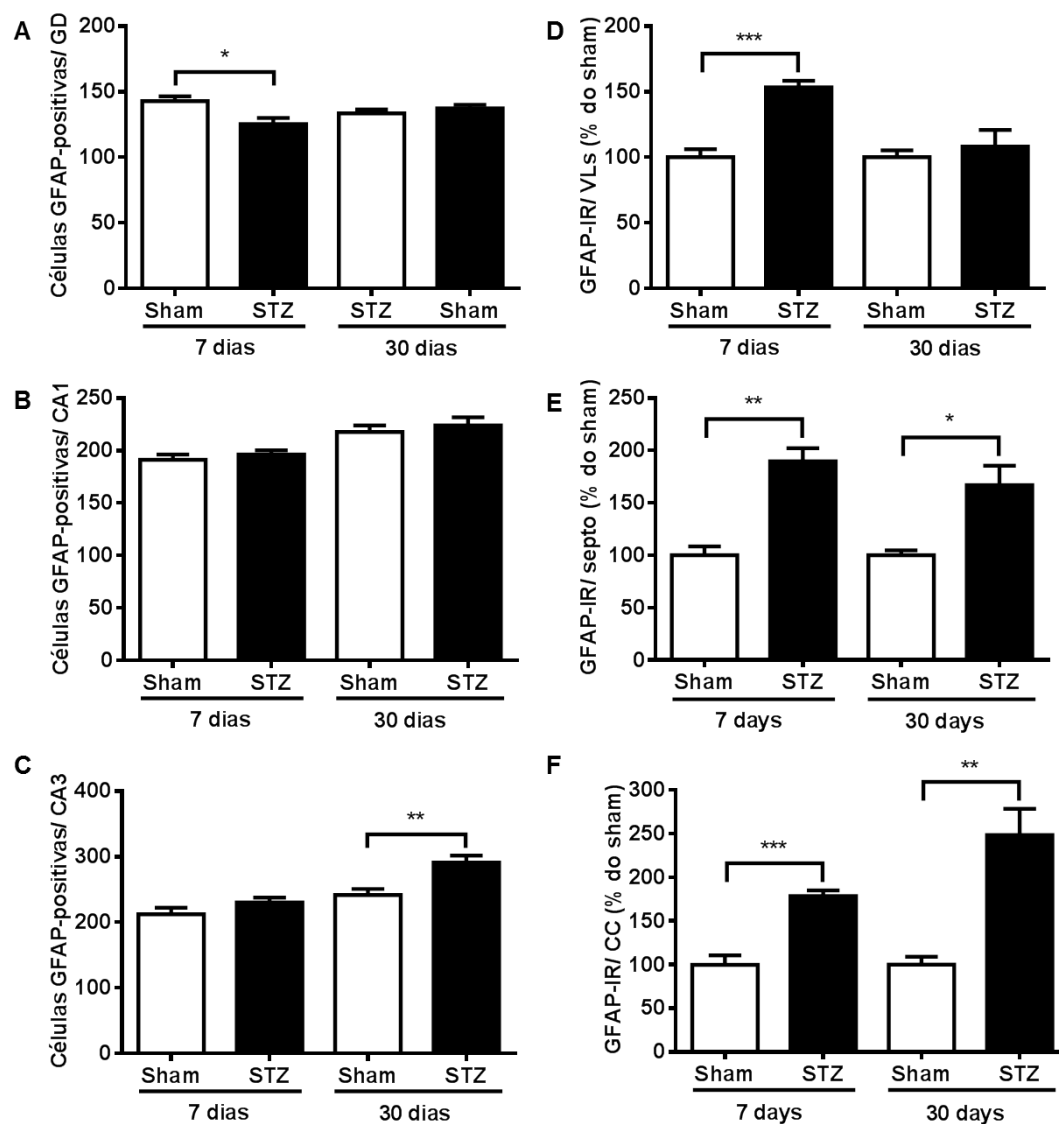
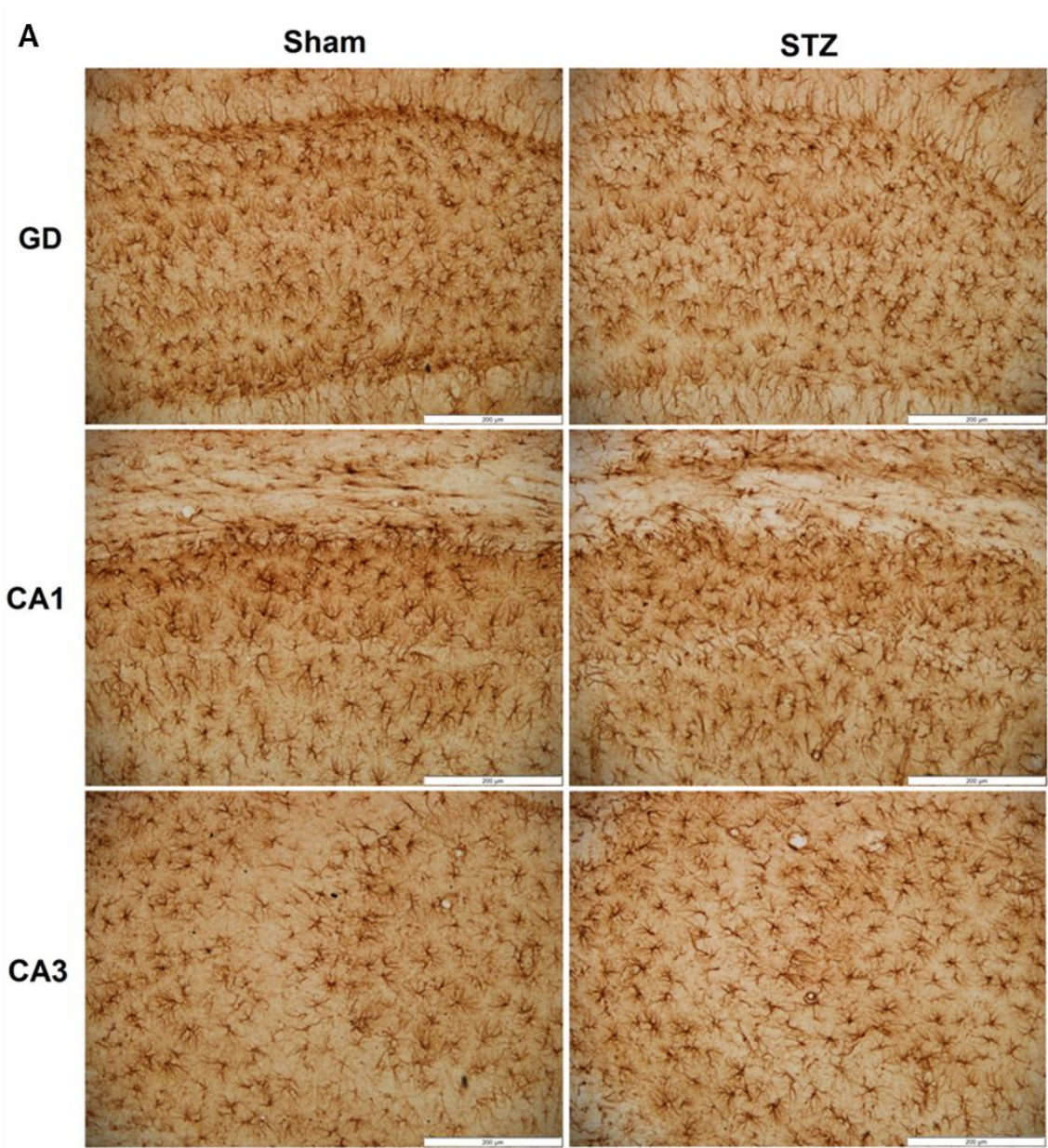


FIGURA 10 - QUANTIFICAÇÃO DE ASTRÓCITOS NO CÉREBRO DE ANIMAIS INJETADOS COM STZ-ICV COMPARADOS COM ANIMAIS SHAM, INDICADO PELA IMUNOMARCAÇÃO COM GFAP. O número de astrócitos aumentou na área CA3 do hipocampo, mas não no giro denteado (GD) e área CA1 aos 30 dias após a injeção ICV de STZ (A-C). A imunorreatividade para GFAP (GFAP-IR) aumentou significativamente em todas as áreas peri-ventriculares (i.e., ventrículos laterais (VLs), septo e corpo caloso (CC)) nos animais STZ-ICV aos 7 e 30 dias depois da cirurgia (D-F). Os dados são expressos como média \pm EPM. $n = 5$ por grupo no dia 7; $n = 6$ por grupo no dia 30. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, vs. grupo sham (teste t de Student bicaudal não pareado).



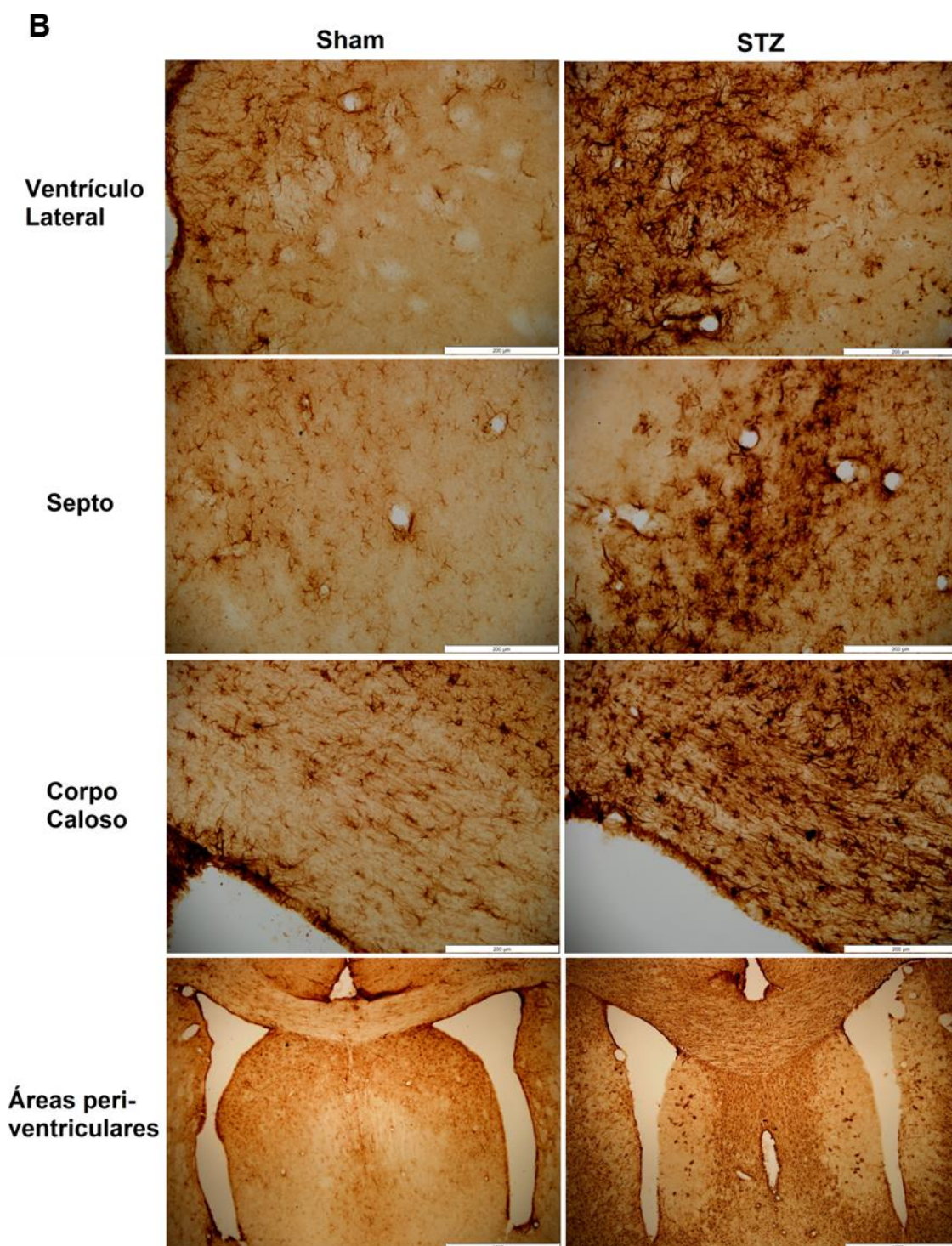


FIGURA 11 - FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS GFAP-POSITIVAS EM ANIMAIS STZ-ICV E ANIMAIS SHAM. Células GFAP-positivas no giro denteado (GD) e áreas CA1 e CA3 do hipocampo (A) e nas áreas periventriculares (i.e., ventrículos laterais, septo e corpo caloso – B). Barra da escala = 200 μm , exceto para áreas peri-ventriculares (barra da escala = 1000 μm).

5.1.4 Efeitos da STZ-ICV sobre a neurogênese na ZSV e no GD do hipocampo

A neurogênese adulta nos dois nichos neurogênicos (i.e., o GD da formação hipocampal e a ZSV dos ventrículos laterais) foi prejudicada nos animais lesados com STZ-ICV. O número de células Ki-67-positivas na ZSG do GD e a imunorreatividade para Ki-67 (Ki-67-IR) na ZSV diminuiu 7 dias após a injeção ICV de STZ (FIGURAS 12A, B, 13), indicando uma redução na proliferação das CTN/ CPN no grupo STZ em comparação com o grupo sham. O número de células com dupla marcação para BrdU e NeuN no GD diminuiu nos animais injetados com STZ quando comparados com os animais sham aos 30 dias depois da cirurgia (FIGURAS 12C, 13), indicando que a STZ-ICV afetou negativamente a maturação e sobrevivência dos novos neurônios no GD do hipocampo. O número de células DCX-positivas no GD e a imunoreatividade para DCX (DCX-IR) na ZSV diminuiu aos 30 dias após a cirurgia, indicando uma redução de neurônios imaturos (i.e., redução de neurogênese) no grupo STZ comparado ao grupo sham (FIGURAS 12D, E, 13). A diminuição da neurogênese em animais injetados com STZ-ICV comparados com animais sham, estava relacionada a um aumento nos níveis de BDNF no córtex pré-frontal (FIGURA 14A), mas não no hipocampo (FIGURA 14B) 7 dias após a cirurgia.

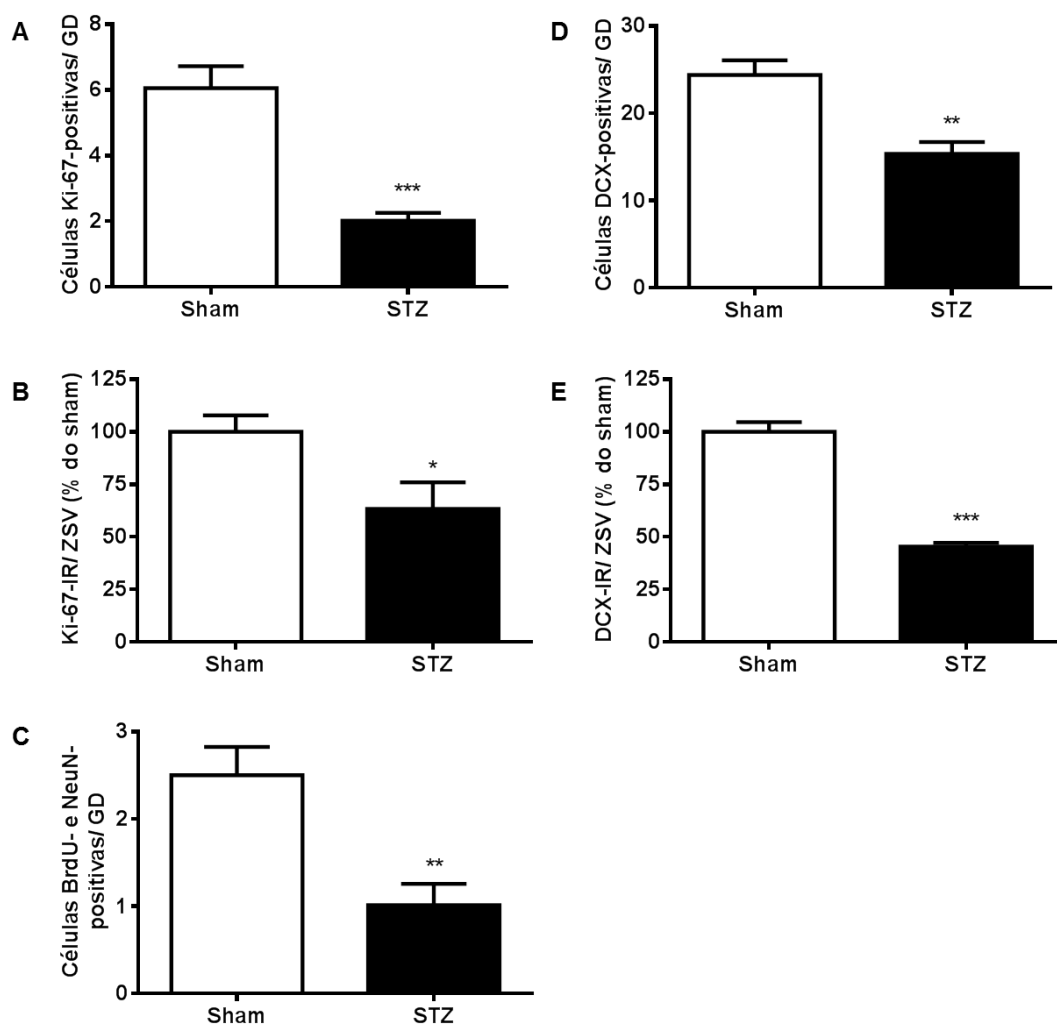


FIGURA 12 - QUANTIFICAÇÃO DA NEUROGÊNESE ADULTA NA ZONA SUBVENTRICULAR (ZSV) E NO GIRO DENTEADO (GD) EM ANIMAIS STZ-ICV COMPARADOS COM ANIMAIS SHAM. A análise imunohistoquímica de células positivas para Ki-67 e Doublecortin (DCX), e duplamente marcadas com BrdU e NeuN foi realizada para detectar células proliferativas, neurônios imaturos e neurônios maduros sobreviventes, respectivamente. A injeção ICV de STZ reduziu a proliferação celular (células Ki-67-positivas) no GD e na ZSV (A, B) aos 7 dias após a cirurgia e diminuiu a sobrevivência e maturação de novos neurônios (células BrdU- e NeuN-positivas) no GD 30 dias depois da injeção de STZ (C), resultando em redução da neurogênese, refletida por menor número de neurônios imaturos (células DCX-positivas) no GD (D) e menor imunorreatividade para (DCX-IR) na ZSV (E) aos 30 dias depois da cirurgia. Os dados são expressos como média \pm EPM. $n = 5$ por grupo no dia 7; $n = 6$ por grupo no dia 30. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, vs. grupo sham (teste t de Student bicaudal não pareado).

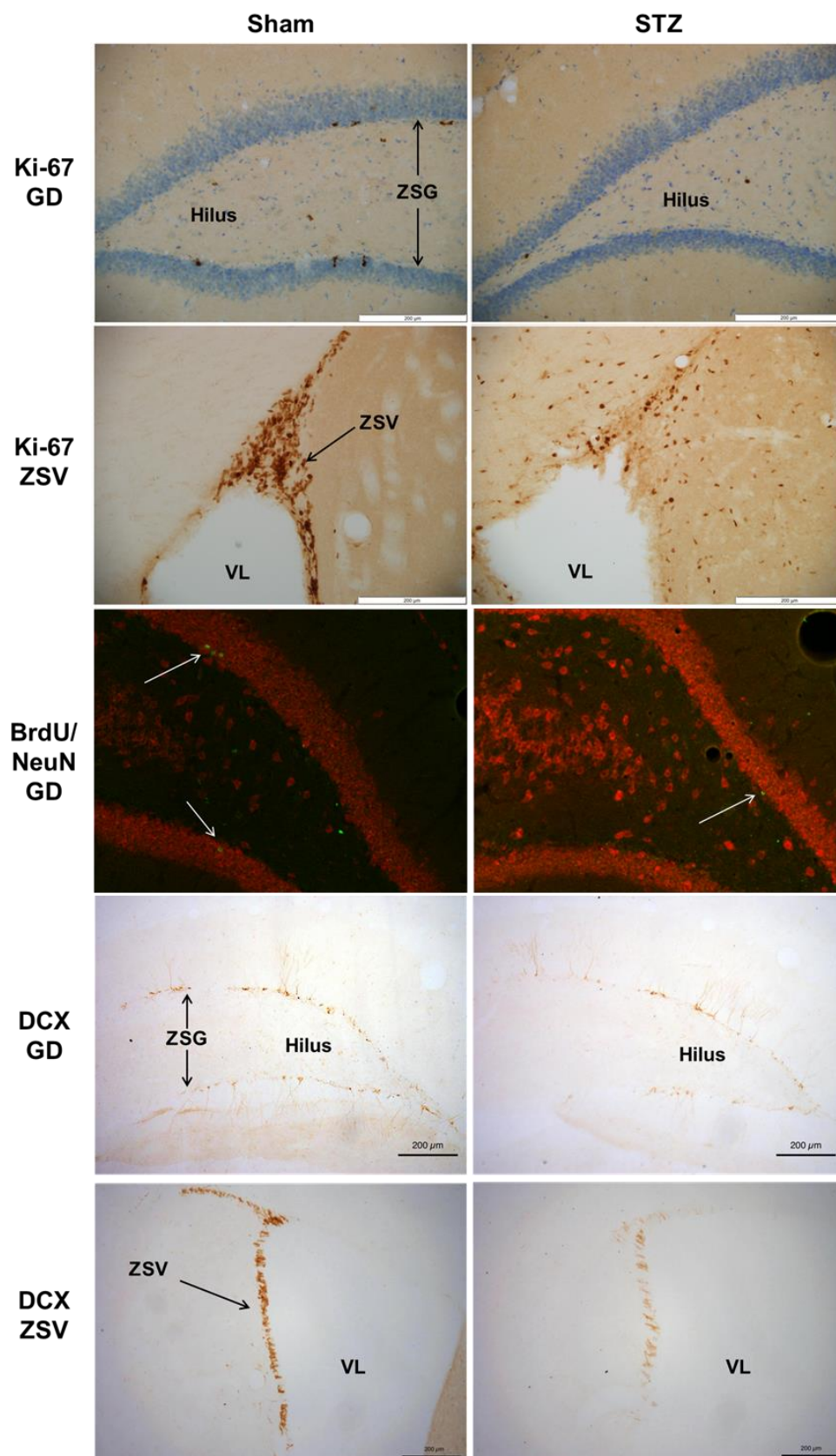


FIGURA 13 - FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE MARCADORES DE NEUROGÊNESE. Células positivas para Ki-67 e DCX no giro denteado (GD) e na zona subventricular (ZSV) e células duplamente marcadas para BrdU e NeuN no GD. O marcador Ki-67 no GD foi contra corado com coloração de Nissl. Setas brancas indicam células duplamente marcadas para BrdU e NeuN no GD (magnificação: 200×). Barra da escala = 200 μm.

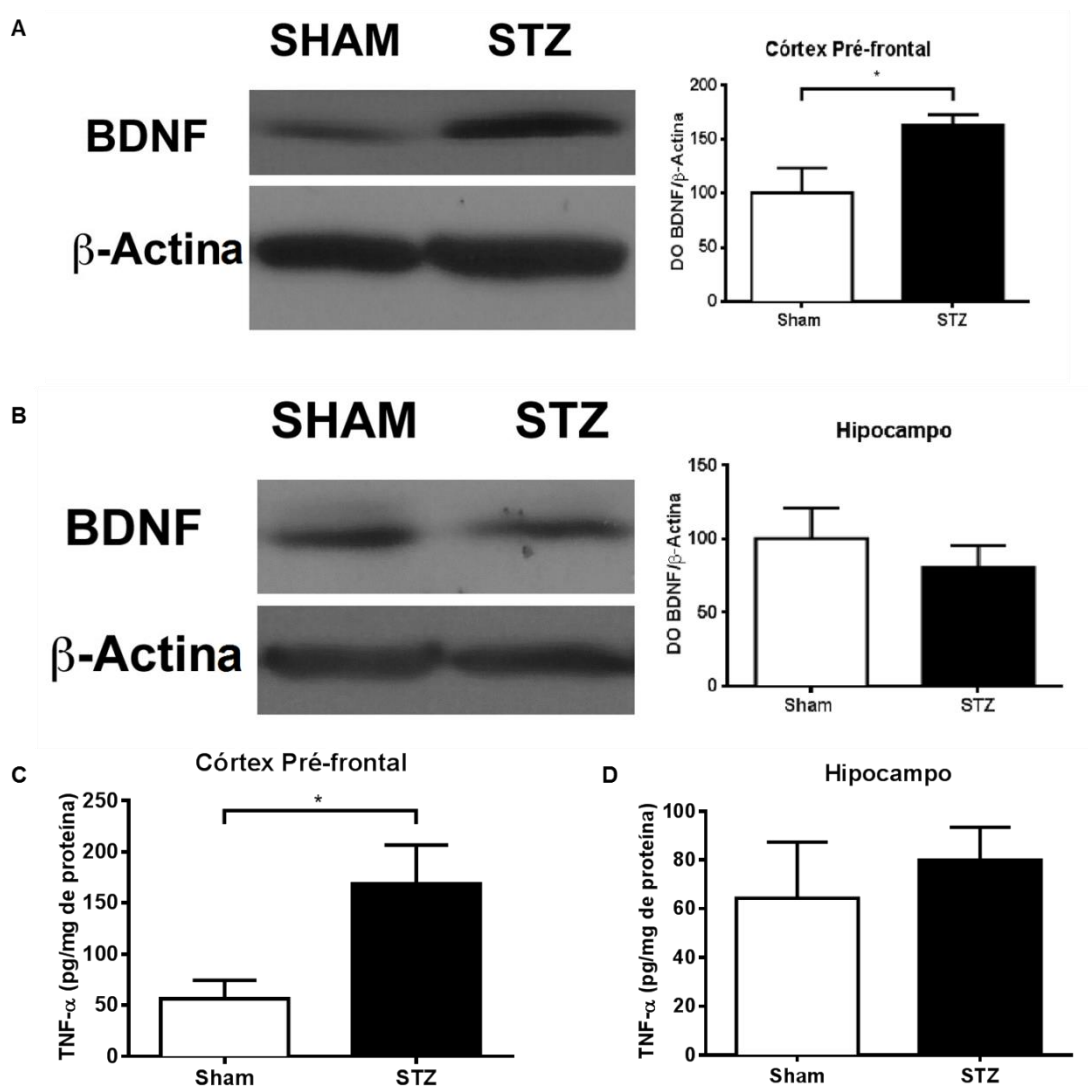


FIGURA 14 - QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE BDNF E TNF- α NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO EM ANIMAIS INJETADOS COM STZ-ICV COMPARADOS COM ANIMAIS SHAM AOS 7 DIAS APÓS A CIRURGIA. O ensaio de western blot foi realizado com anticorpos anti-BDNF e anti- β -actina (controle para a quantificação). Os blots foram densitometricamente quantificados no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B), normalizados para β -actina e o resultado foi expresso como porcentagem do grupo sham. Os níveis de TNF- α foram quantificados por ELISA no córtex pré-frontal (C) e hipocampo (D). Os dados são expressos como média \pm EPM. $n = 6$ por grupo. $*p < 0,05$, vs. grupo sham (teste t de Student bicaudal não pareado).

5.2 PARTE 2 - RESULTADOS REFERENTES AO EXPERIMENTO 3

5.2.1 Caracterização comportamental não cognitiva dos animais lesados com STZ-ICV e tratados com curcumina

O teste do campo aberto foi realizado 21 dias após a injeção de STZ-ICV para avaliar a locomoção espontânea e o comportamento exploratório. O teste do LCE foi realizado no dia 22 após a injeção de STZ-ICV para avaliar o comportamento tipo ansioso dos animais. Ambos poderiam interferir no desempenho dos animais nos testes cognitivos. A análise da atividade locomotora espontânea no campo aberto não revelou alterações nos parâmetros motores analisados em todos os grupos quando comparados ao grupo sham (TABELA 3). No LCE, uma redução no tempo e na porcentagem de tempo gasto nos braços fechados foi observada nos grupos STZ e STZ+cur 100 comparados ao grupo sham (TABELA 4), sugerindo uma redução no comportamento tipo ansioso nesses grupos. O comportamento tipo ansioso poderia diminuir a exploração de novidades no TLO, TRO e labirinto em Y. Contudo, nenhum dos grupos apresentou mais comportamento tipo ansioso que o grupo sham em todos os parâmetros do LCE (TABELA 4).

A glicemia elevada é outro fator que foi avaliado, pois poderia interferir no desempenho cognitivo dos animais (ALVAREZ et al., 2009). Os níveis de glicose sanguínea foram medidos 30 dias depois da cirurgia, após os testes comportamentais, para assegurar que os animais não se tornaram diabéticos. Não houve alterações significativas na glicemia de todos os grupos quando comparados ao grupo sham ($p > 0,05$; dados não mostrados).

TABELA 3 - TESTE DO CAMPO ABERTO EM ANIMAIS LESADOS COM STZ E TRATADOS COM CURCUMINA

| | Sham | STZ | STZ+cur 25 | STZ+cur 50 | STZ+cur 100 |
|-----------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| Número total de cruzamentos | 91.86 ± 8.97 | 100.00 ± 16.85 | 85.67 ± 13.11 | 60.57 ± 15.91 | 82.83 ± 12.02 |
| Cruzamentos na periferia | 76.43 ± 5.972 | 79.50 ± 15.41 | 74.17 ± 12.32 | 48.86 ± 13.14 | 67.00 ± 7.66 |
| Cruzamentos no centro | 6.86 ± 2.09 | 9.25 ± 2.02 | 5.83 ± 0.83 | 5.43 ± 1.90 | 7.67 ± 1.89 |
| Tempo na periferia (s) | 272.40 ± 1.70 | 247.50 ± 12.45 | 278.50 ± 6.04 | 204.90 ± 45.62 | 248.30 ± 27.15 |
| Tempo no centro (s) | 27.61 ± 1.70 | 52.51 ± 12.45 | 21.43 ± 6.04 | 95.08 ± 45.62 | 51.62 ± 27.15 |
| Frequência de levantar | 32.43 ± 3.05 | 31.25 ± 4.80 | 28.17 ± 4.18 | 22.57 ± 6.66 | 18.33 ± 4.06 |

Os dados são expressos como ± EPM. ANOVA de uma via com o teste de comparações múltiplas de Tukey.

TABELA 4 - LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO DOS ANIMAIS LESADOS COM STZ E TRATADOS COM CURCUMINA

| | Sham | STZ | STZ+cur 25 | STZ+cur 50 | STZ+cur 100 |
|--------------------------------|----------------|------------------|---------------|----------------|-----------------|
| Tempo nos braços abertos (s) | 44.87 ± 15.17 | 148.00 ± 27.06 | 82.46 ± 12.80 | 101.50 ± 21.73 | 109.80 ± 40.20 |
| Tempo nos braços fechados (s) | 210.80 ± 14.89 | 106.80 ± 19.56** | 178.50 ± 9.90 | 131.00 ± 22.38 | 114.30 ± 28.38* |
| % de tempo nos braços abertos | 14.96 ± 5.06 | 49.32 ± 9.02 | 27.49 ± 4.27 | 33.82 ± 7.25 | 36.60 ± 13.40 |
| % de tempo nos braços fechados | 70.25 ± 4.97 | 35.58 ± 6.52** | 59.49 ± 3.30 | 43.67 ± 7.46 | 38.09 ± 9.46* |
| Entradas nos braços abertos | 4.57 ± 1.27 | 9.13 ± 2.37 | 7.00 ± 1.00 | 6.43 ± 1.45 | 5.00 ± 1.44 |
| Entradas nos braços fechados | 11.29 ± 0.75 | 7.38 ± 1.72 | 9.50 ± 1.26 | 6.43 ± 1.66 | 9.17 ± 3.09 |
| Total de entradas | 15.86 ± 1.50 | 16.50 ± 2.41 | 16.50 ± 1.26 | 12.86 ± 2.96 | 14.17 ± 4.49 |
| Avaliação de risco | 10.14 ± 1.18 | 6.13 ± 1.83 | 6.33 ± 1.73 | 6.00 ± 1.66 | 6.33 ± 2.25 |
| Mergulho da cabeça | 7.00 ± 2.38 | 20.88 ± 4.89 | 15.50 ± 2.45 | 14.71 ± 4.03 | 12.83 ± 2.64 |

Os dados são expressos como média ± EPM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. grupo sham. ANOVA de uma via com o teste de comparações múltiplas de Tukey.

5.2.2 A injeção ICV de STZ causou prejuízos cognitivos que foram parcialmente prevenidos pelo tratamento prolongado com curcumina

A memória espacial de curto prazo foi avaliada no TLO e no labirinto em Y nos dias 28 e 30 após a cirurgia, respectivamente, com 1 h de intervalo entre as sessões treino e teste. A memória de reconhecimento de curto prazo foi avaliada pelo TRO no dia 29 após a cirurgia, com 1 h de intervalo entre as sessões treino e teste. Os animais lesados com STZ-ICV exibiram déficits na memória espacial de curta duração evidenciado por um menor índice de discriminação no TLO (FIGURA 15A) e redução no tempo gasto no braço novo no labirinto em Y (FIGURA 15C) quando comparados aos animais do grupo sham. No TLO, nenhum dos grupos tratados com curcumina apresentou índice de discriminação significativamente maior que o grupo STZ (FIGURA 15A). No labirinto em Y, nenhum dos grupos tratados com curcumina passou mais tempo no braço novo que o grupo STZ; nem o tempo gasto no braço novo foi significativamente maior que 33% (FIGURA 15C). Portanto, o tratamento com curcumina dos animais lesados com STZ-ICV em todas as doses não preveniu o prejuízo na memória espacial de curto prazo. No TRO, os animais lesados com STZ-ICV exibiram déficits na memória de reconhecimento de curto prazo, o que foi evidenciado pela redução no índice de discriminação (FIGURA 15B)

quando comparados com o grupo sham. Os grupos STZ+cur 50 e STZ+cur 100 apresentaram um maior índice de discriminação quando comparados com o grupo STZ, o que sugere um possível efeito benéfico da curcumina na memória de reconhecimento de curto prazo nessas doses testadas.

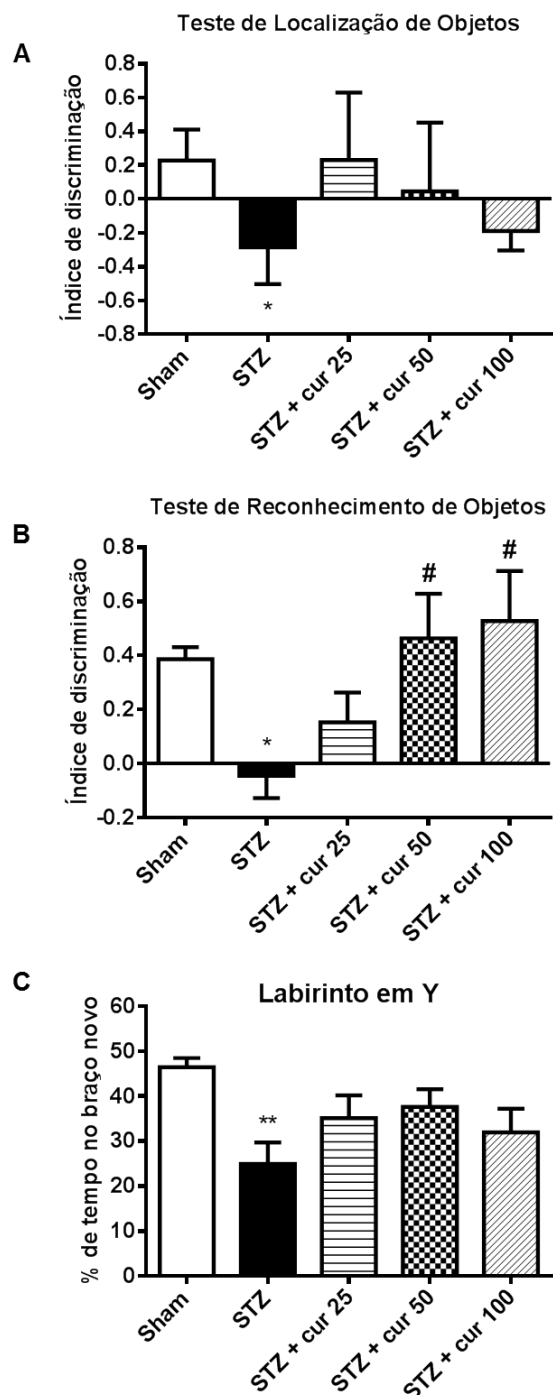


FIGURA 15 - EFEITOS DA CURCUMINA NO DESEMPENHO COGNITIVO DE ANIMAIS INJETADOS COM STZ-ICV. O desempenho cognitivo dos animais foi avaliado pelos testes de localização de objetos (A), reconhecimento de objetos (B) e versão espacial do labirinto em Y (C). Os dados são expressos como média \pm EPM. $n = 6-8$ por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, vs. grupo sham, # $p < 0,05$, vs. grupo STZ (ANOVA de uma via com o teste de comparações múltiplas de Tukey).

5.2.3 Efeitos da curcumina na neurogênese em animais lesados com STZ

Os animais lesados com STZ-ICV exibiram diminuição na proliferação celular das CTN/ CPN, evidenciado pela redução na imunorreatividade para Ki-67 (Ki-67-IR) na ZSV dos ventrículos laterais (FIGURA 16A, 17A) e redução no número de células Ki-67-positivas na ZSG do GD do hipocampo (FIGURA 16B, 17A). Entretanto, o tratamento prolongado com curcumina em todas as doses não restaurou a Ki-67-IR na ZSV dos ventrículos laterais (FIGURA 16A) e nem o número de células Ki-67-positivas na ZSG do GD do hipocampo comparado ao grupo STZ (FIGURA 16B), apesar de um pequeno aumento não-significativo para o grupo STZ+cur 100 no GD. De forma similar, os animais lesados com STZ-ICV exibiram uma diminuição de neurônios imaturos em ambos os nichos neurogênicos, evidenciado por uma redução na imunorreatividade para DCX (DCX-IR) na ZSV dos ventrículos laterais (FIGURA 16C, 17B) e uma redução no número de células DCX-positivas do GD do hipocampo comparado ao grupo sham (FIGURA 16D, 17B). Contudo, o tratamento prolongado com curcumina em todas as doses não restaurou a DCX-IR na ZSV dos ventrículos laterais (FIGURA 16C) e nem o número de células DCX-positivas na ZSG do GD do hipocampo comparado ao grupo STZ (FIGURA 16D), apesar de um pequeno aumento não-significativo para o grupo STZ+cur 100 no GD.

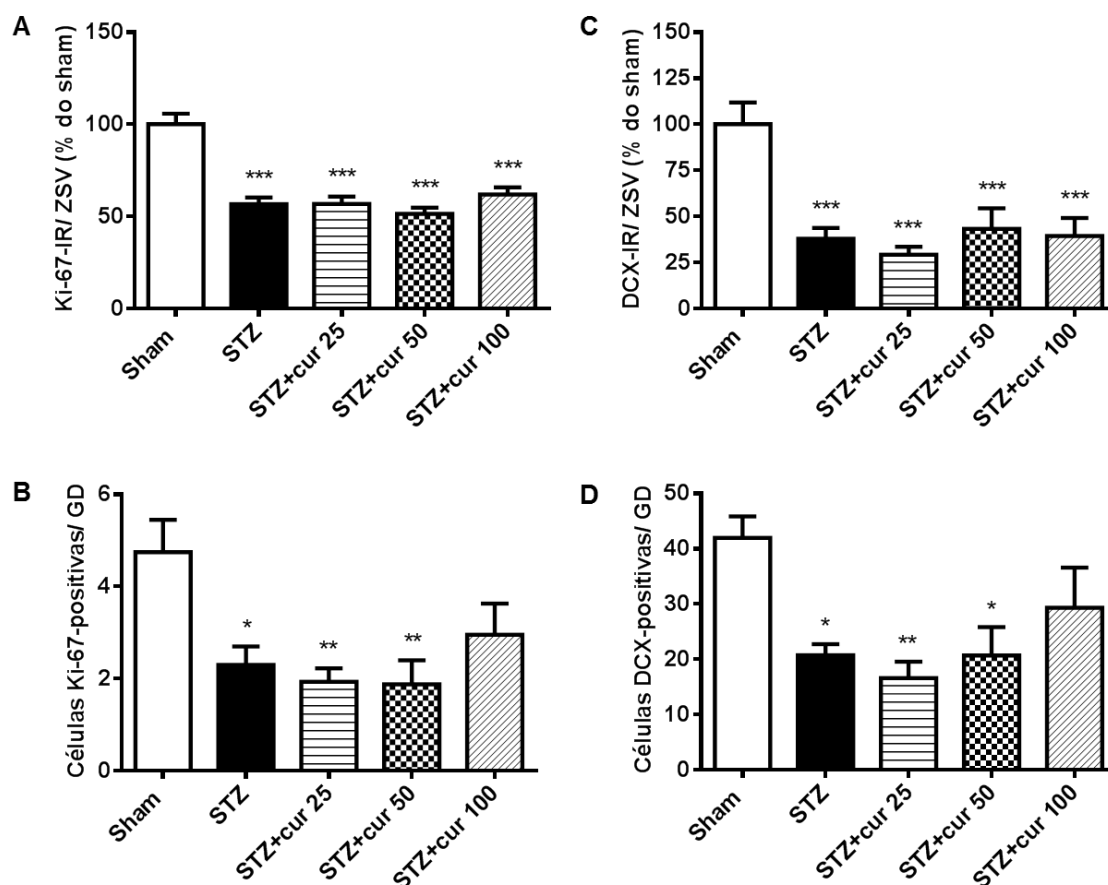
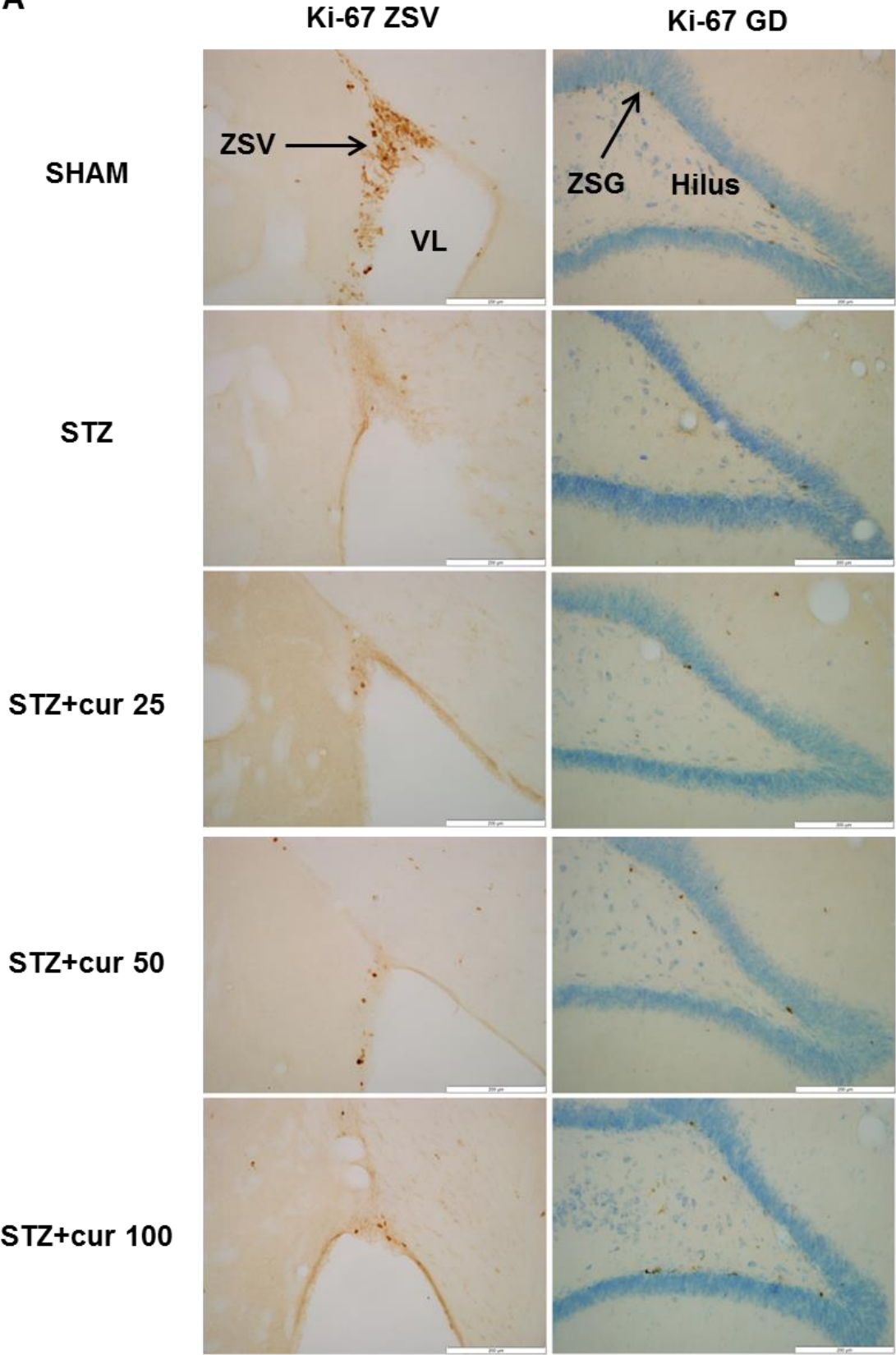


FIGURA 16 - QUANTIFICAÇÃO DOS EFEITOS DA CURCUMINA SOBRE A NEUROGÊNESE ADULTA EM ANIMAIS INJETADOS COM STZ-ICV. A análise imunohistoquímica de células positivas para Ki-67 e DCX foi realizada para detectar células proliferativas e neurônios imaturos, respectivamente. A injeção ICV de STZ reduziu a proliferação das CTN/CPN (células Ki-67-positivas) na ZSV (A) e no GD (B) e reduziu o número de neurônios imaturos (células DCX-positivas) na ZSV (C) e no GD (D) aos 30 dias depois da cirurgia. O tratamento com curcumina restaurou parcialmente o número de células positivas para Ki-67 e DCX somente no GD e somente na maior dose (100 mg/kg). Os dados são expressos como média \pm EPM. $n = 6$ por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, vs. grupo sham (ANOVA de uma via com o teste de comparações múltiplas de Tukey).

A



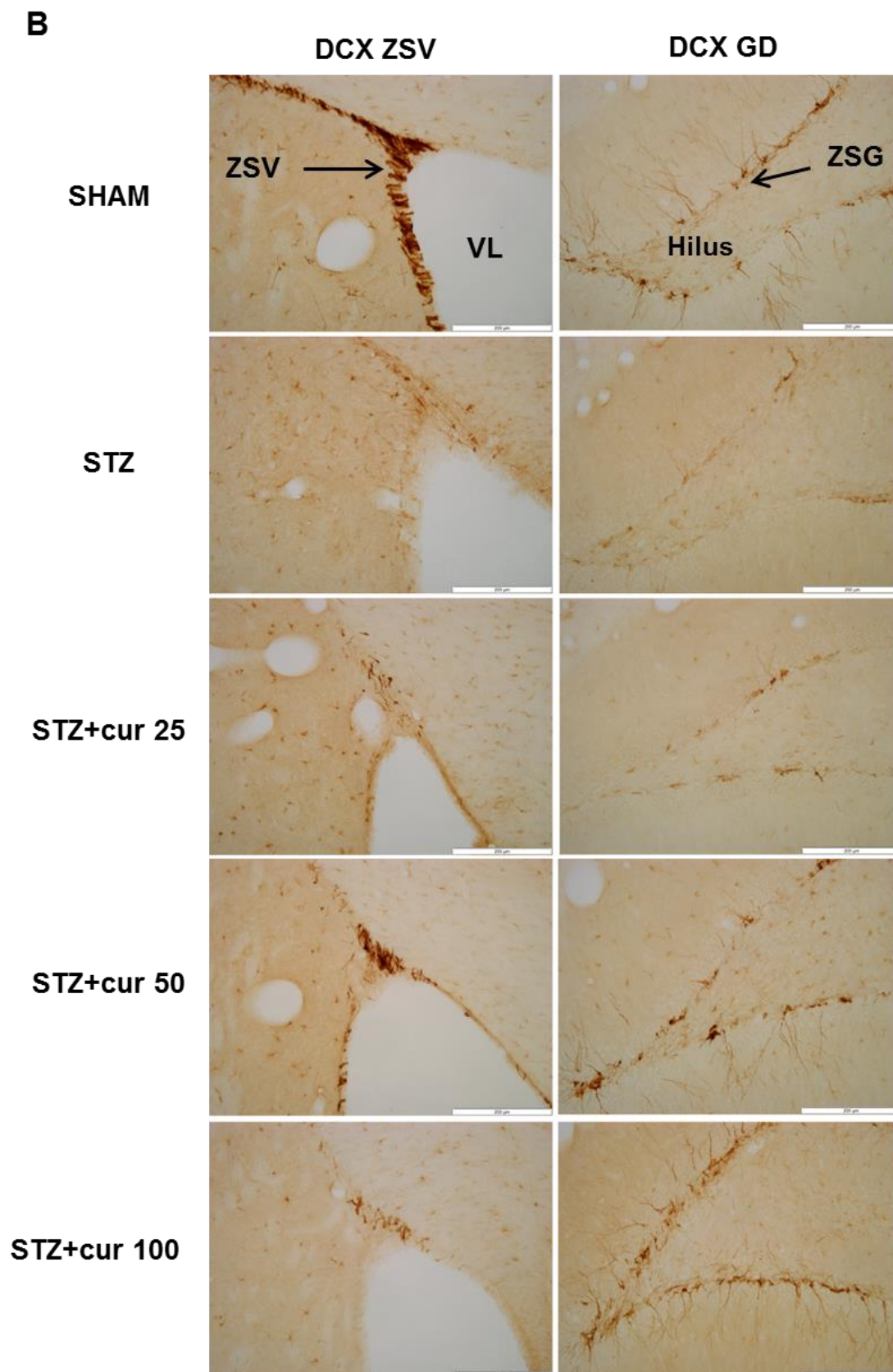


FIGURA 17 - FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS POSITIVAS PARA KI-67 (A) E DOUBLECORTIN (DCX – B) NO GIRO DENTEADO (GD) E NA ZONA SUBVENTRICULAR (ZSV). Nas lâminas do marcador Ki-67 no GD foi realizada a contra-coloração de Nissl para visualização da ZSG. Barra da escala = 200 μ m.

5.2.4 Efeitos da curcumina nos marcadores gliais em animais lesados com STZ

A imunorreatividade para Iba-1 e GFAP foi usada para avaliar os efeitos do tratamento prolongado com curcumina sobre os marcadores gliais e a neuroinflamação. Aos 30 dias depois da cirurgia, o grupo STZ apresentou um aumento acentuado na Iba-IR em todas as áreas peri-ventriculares analisadas (i.e., ventrículos laterais, septo e corpo caloso) (FIGURA 18A-C, 19A) e também nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo dorsal, mas não no GD quando comparado com o grupo sham (FIGURA 18D-F, 19B). O tratamento com curcumina nas doses de 25 e 50 mg/kg mostrou uma moderada redução na Iba-1-IR no corpo caloso (FIGURA 18C), mas não nos ventrículos laterais (FIGURA 18A), septo (FIGURA 18B) e hipocampo (FIGURA 18D-F), apesar de uma diminuição não significativa nos ventrículos laterais e septo. De forma similar, os animais injetados com STZ-ICV mostraram um notável aumento na GFAP-IR em todas as áreas peri-ventriculares analisadas (FIGURAS 20A-C, 21A) e também no GD e áreas CA1 e CA3 do hipocampo dorsal quando comparados ao grupo sham (FIGURAS 20D-F, 21B). O tratamento com curcumina não diminuiu a GFAP-IR nas áreas peri-ventriculares e no hipocampo em todas as doses testadas (FIGURA 20A-F, 21A, B).

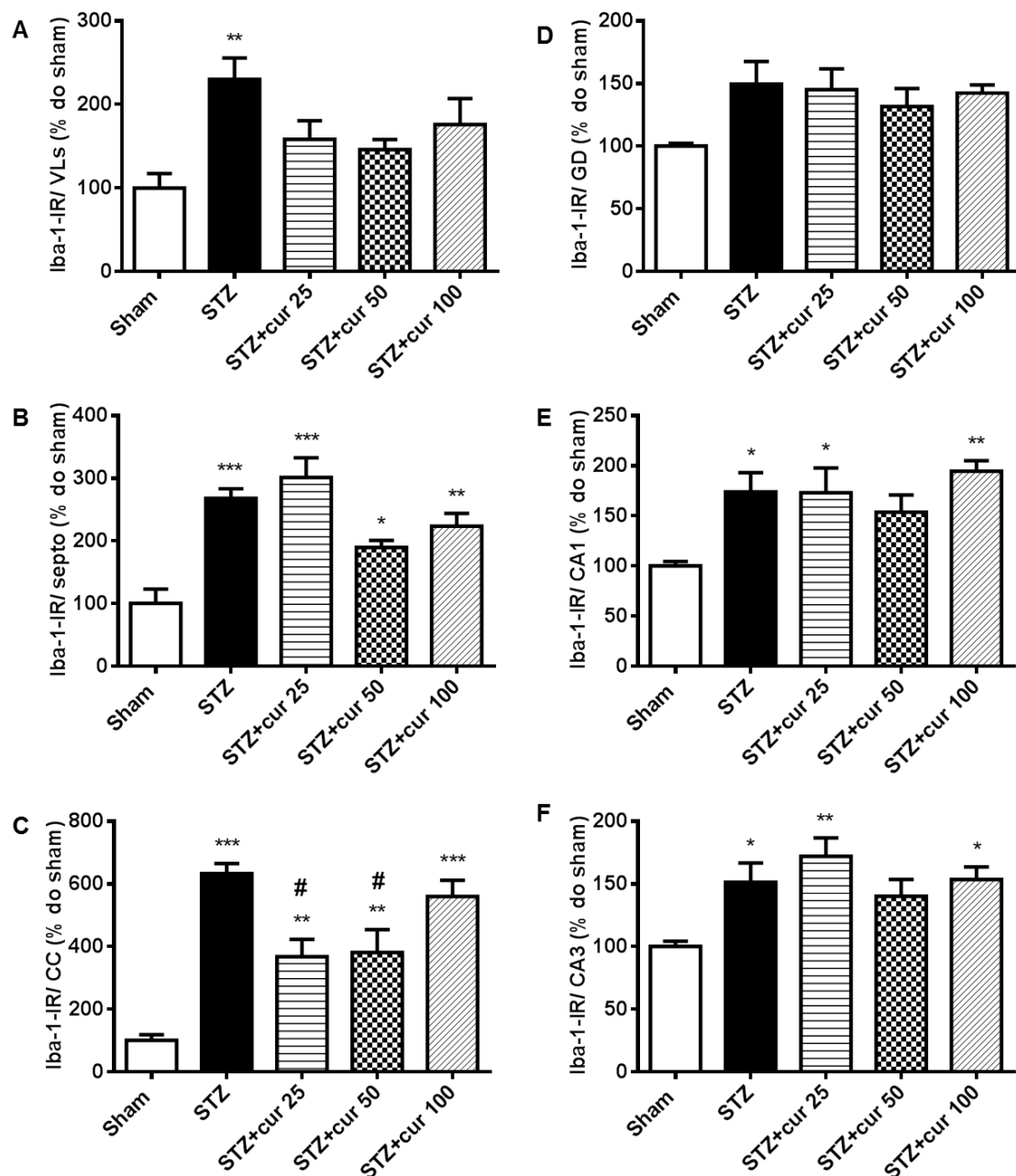
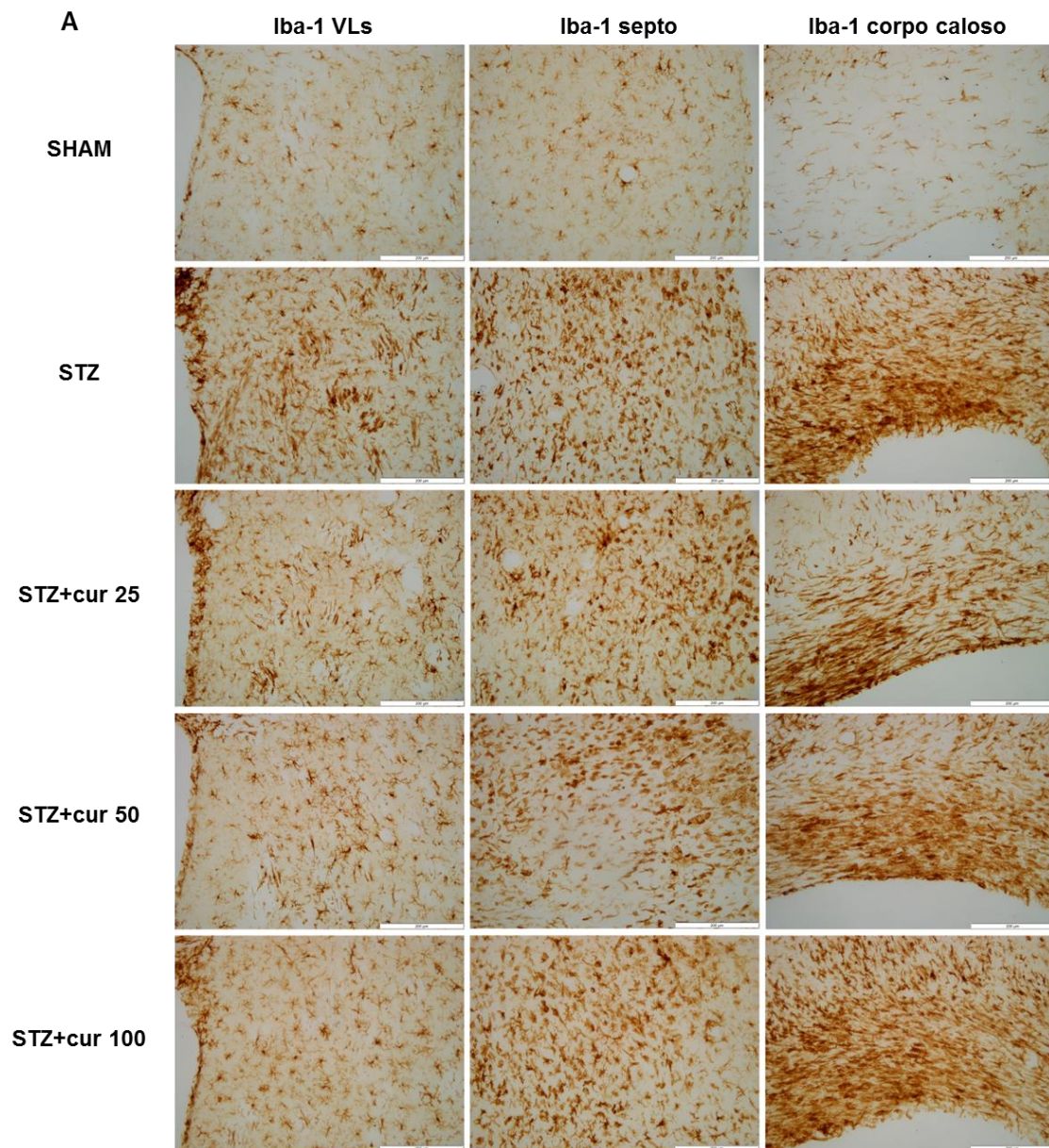


FIGURA 18 - EFEITOS DA CURCUMINA NAS CÉLULAS MICROGLIAIS (I.E., IMUNORREATIVIDADE PARA IBA-1) EM ANIMAIS STZ-ICV. A Iba-1-IR aumentou significativamente nas áreas peri-ventriculares (i.e., ventrículos laterais (VLs), septo e corpo caloso (CC)) (A-C) e nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo (E, F) 30 dias após a cirurgia em ratos que receberam STZ-ICV. O tratamento com curcuma nas doses de 25 e 50 mg/kg reduziu parcialmente a Iba-1-IR nos VLs e corpo caloso, e o grupo STZ+cur 50 exibiu uma redução parcial na Iba-1-IR nas áreas CA1 e CA3. Os dados são expressos como média \pm EPM. $n = 6$ por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, vs. grupo sham, # $p < 0,05$, vs. grupo STZ (ANOVA de uma via com o teste de comparações múltiplas de Tukey).



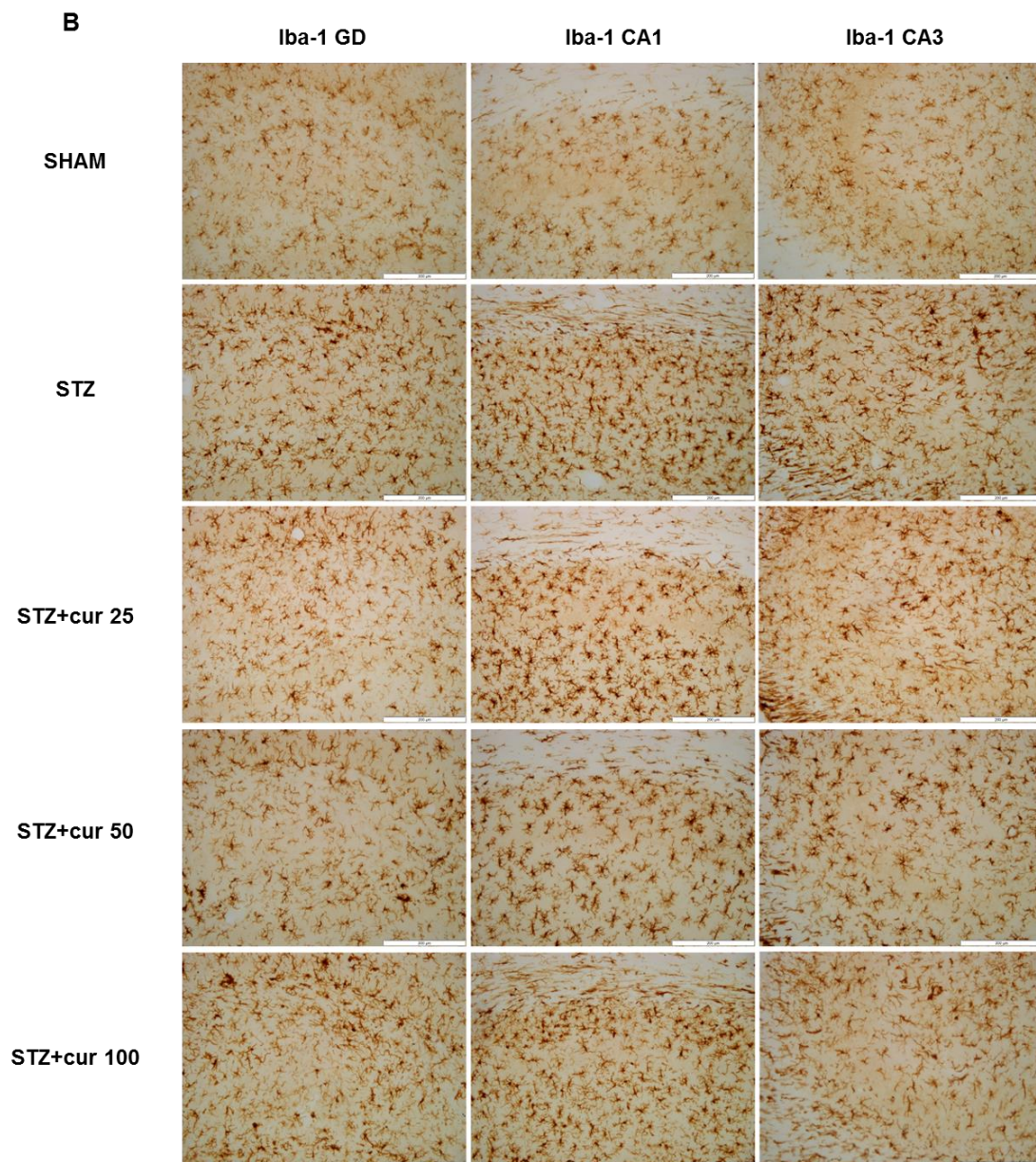


FIGURA 19 - FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS MICROGLIAIS IMUNORREATIVAS PARA IBA-1. A imunorreatividade para Iba-1 foi avaliada 30 dias após a injeção ICV de STZ nas áreas peri-ventriculares (i.e., ventrículos laterais (VLs), septo e corpo caloso - A) e no hipocampo (giro dentado (GD) e áreas CA1 e CA3 - B). Barra da escala = 200 μ m.

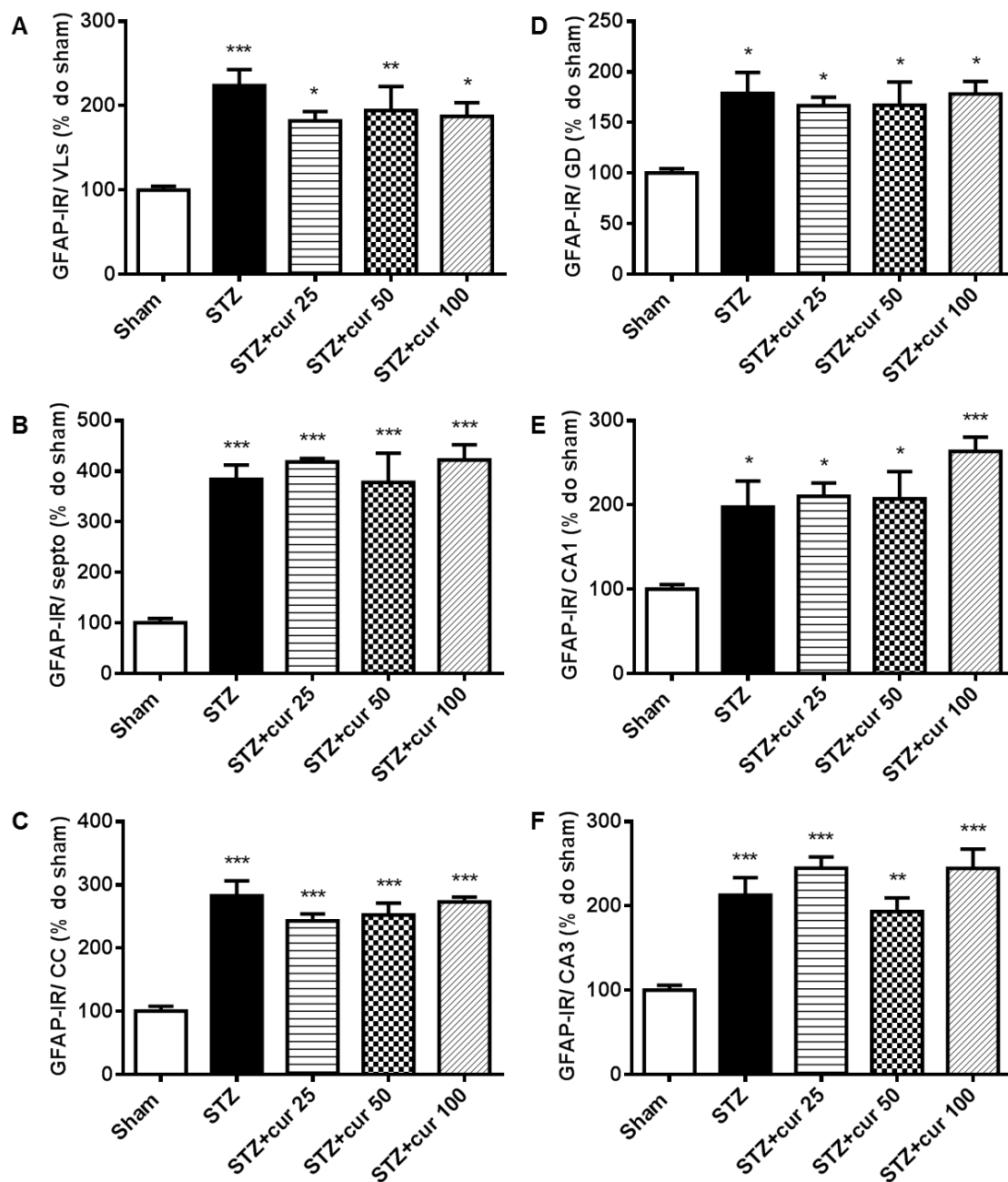
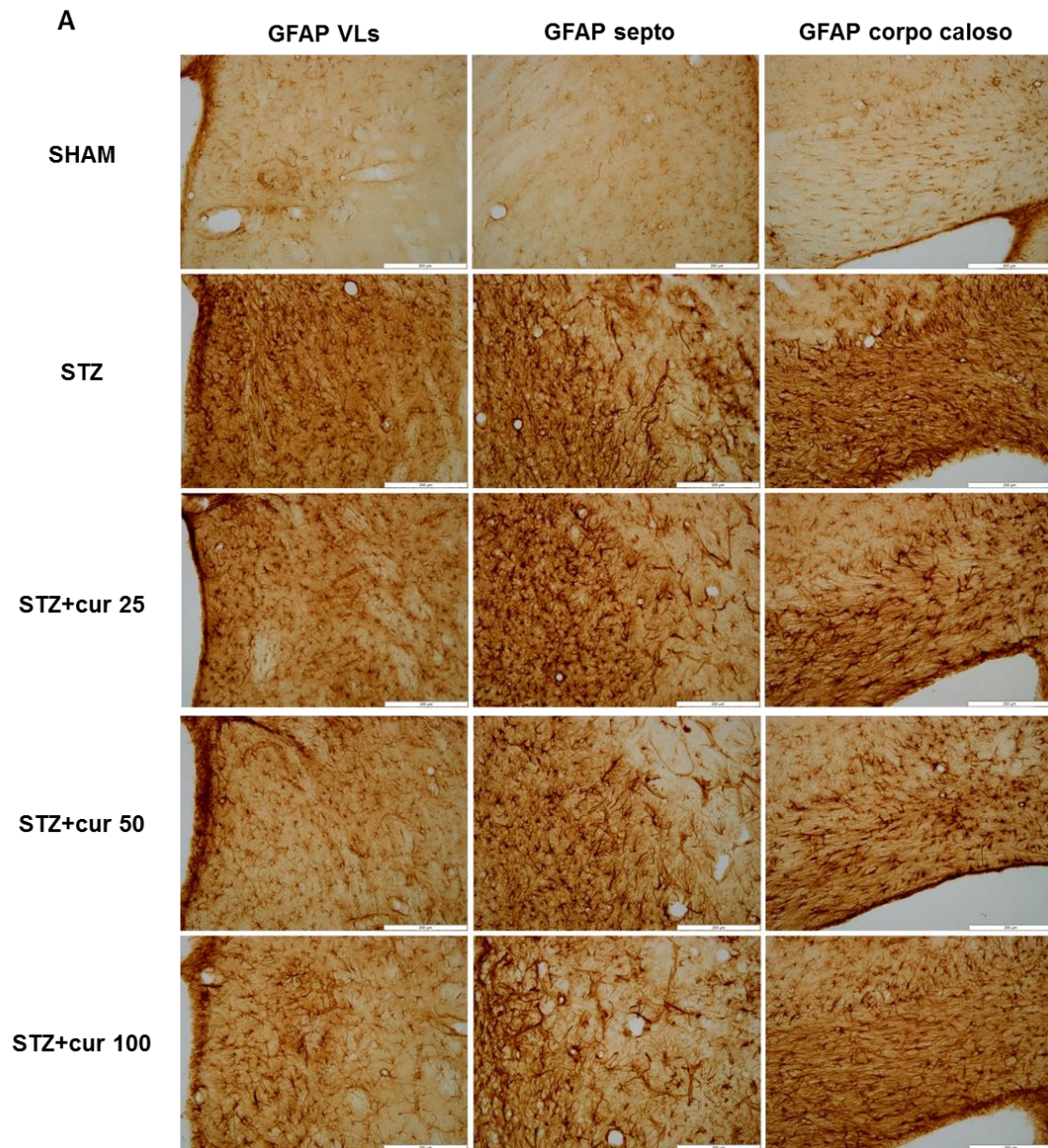


FIGURA 20 - EFEITOS DA CURCUMINA SOBRE OS ASTRÓCITOS IMUNORREATIVOS PARA GFAP EM ANIMAIS LESADOS COM STZ-ICV. A imunorreatividade para GFAP (GFAP-IR) aumentou significativamente nas áreas peri-ventriculares (i.e., ventrículos laterais (VLs), septo e corpo caloso (CC) - A-C) e no hipocampo (giro dentado (GD) e áreas CA1 e CA3 - D-F) 30 dias depois da injeção ICV de STZ. O tratamento com curcumina não reduziu a GFAP-IR em todas as áreas do hipocampo e peri-ventriculares analisadas. Os dados são expressos como média \pm EPM. $n = 6$ por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, vs. grupo sham (ANOVA de uma via com o teste de comparações múltiplas de Tukey).



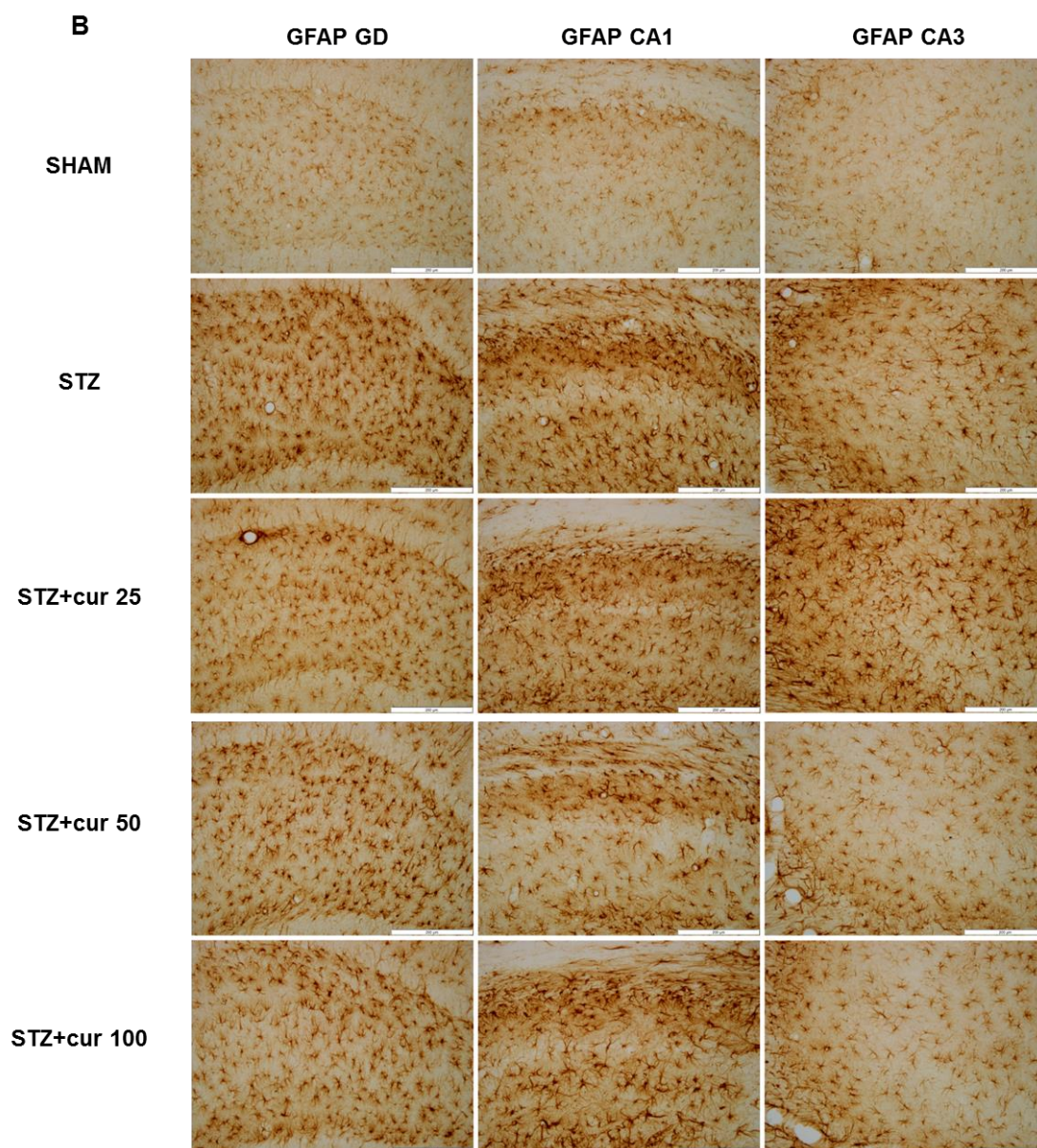


FIGURA 21 - FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE ASTRÓCITOS IMUNORREATIVOS PARA GFAP. A imunorreatividade para GFAP foi avaliada 30 dias após a injeção ICV de STZ nas áreas peri-ventriculares (i.e., ventrículos laterais (VLs), septo e corpo caloso – A) e no hipocampo (giro dentado (GD) e áreas CA1 e CA3 - B). Barra da escala = 200 μ m.

6 DISCUSSÃO

A primeira parte deste trabalho buscou caracterizar a pouco estudada relação entre a neuroinflamação, a neurogênese adulta e a memória espacial no modelo de DA esporádica induzido por injeção ICV de STZ em ratos Wistar. Os animais injetados com STZ-ICV exibiram prejuízos na memória espacial de curto prazo avaliada no TLO e no labirinto em Y (FIGURA 7C, D), além de

prejuízos na memória espacial de longo prazo avaliada pelo condicionamento de medo ao contexto 30 dias após a administração de STZ (TABELA 2). Prejuízos cognitivos progressivos relacionados principalmente às funções dependentes do hipocampo, como o aprendizado e a memória espacial, têm sido extensivamente relatados em animais infundidos com STZ-ICV (BIASIBETTI et al., 2013; CHEN et al., 2012; HOSSEINZADEH et al., 2013; JAVED et al., 2012; LANNERT; HOYER, 1998; MAYER; NITSCH; HOYER, 1990). Essas características são relevantes para modelos animais de DA, pois a desorientação espacial e temporal (TU et al., 2015) e prejuízos na memória episódica (i.e., a função cognitiva que integra os componentes 'o que', 'quando' e 'onde' de um episódio ou evento) são as características mais precoces do prejuízo cognitivo progressivo que acomete pacientes com a DA (DERE; PAUSE; PIETROWSKY, 2010).

Avaliações comportamentais não relacionadas à cognição também foram realizadas empregando o teste do campo aberto e o LCE. O grupo STZ-ICV exibiu um aumento na atividade locomotora (i.e., número total de cruzamentos; FIGURA 7A) no campo aberto, mas não mostrou diferença na frequência de levantamentos (rearing) quando comparado ao grupo sham (FIGURA 7B). Esses resultados são consistentes com relatos prévios de aumento da atividade locomotora (CHEN et al., 2012). Os animais do grupo STZ também passaram mais tempo nos braços abertos do LCE e apresentaram aumento nas entradas nos braços abertos (TABELA 1), sugerindo uma redução do comportamento tipo ansioso nos animais STZ quando comparados aos animais sham. Esses resultados foram inesperados ao se considerar estudos prévios que mostravam aumento do comportamento tipo ansioso em camundongos injetadas com STZ-ICV (CHEN et al., 2012). Essa discrepância poderia ser atribuída a diferenças na idade, gênero e espécie dos animais testados e ao intervalo de tempo entre as injeções de STZ e os testes comportamentais. O aparente efeito ansiolítico da STZ no presente estudo também pode ser resultado do aumento da atividade locomotora dos animais (i.e., aumento no total de entradas e nas entradas nos braços abertos do LCE). Vale destacar, que aproximadamente 60-90% dos pacientes com DA desenvolvem alterações neuropsiquiátricas como alucinações, depressão,

ansiedade, entre outros (CUMMINGS et al., 2016). Assim, os resultados acima indicam algumas limitações do modelo animal.

A neuroinflamação é outra característica importante encontrada nos cérebros *post-mortem* de pacientes com a DA e está associada à astrogliose e microgliose reativas e expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias (FUSTER-MATANZO et al., 2013; SERRANO-POZO et al., 2013). Acredita-se que a neuroinflamação participe da patogênese da DA devido à sua correlação com o declínio progressivo das funções cognitivas (SIMPSON et al., 2010). Os mecanismos que desencadeiam o processo inflamatório no cérebro de pacientes com DA são controversos. Sugere-se que a inflamação crônica observada nesta doença seja resultado do acúmulo de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares que são neurotóxicos. A resposta inflamatória inicialmente pode ser benéfica devido à fagocitose dos agregados proteicos pela micróglia e pela secreção de fatores de crescimento como o GDNF, o qual estimula a sobrevivência neuronal. Contudo, a ativação crônica de astrócitos e micróglia é capaz de induzir a necrose de neurônios adjacentes pela liberação de radicais livres, enzimas proteolíticas, aminoácidos excitatórios e fatores do complemento (FUSTER-MATANZO et al., 2013). Em modelos animais de DA esporádica induzidos pela administração ICV de STZ a neuroinflamação provavelmente se desenvolve como consequência da injúria neuronal causada pelo estresse oxidativo induzido pela STZ (WEINSTOCK; SHOHAM, 2004). O estresse oxidativo se desenvolve mediante a decomposição da STZ que gera H_2O_2 e óxido nítrico, originando espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (KWON et al., 1994; TAKASU et al., 1991). Um pronunciado estresse oxidativo no modelo STZ-ICV já foi relatado em muitos estudos (AGRAWAL et al., 2009; EJAZ AHMED et al., 2013; ISHRAT et al., 2009; SHARMA; GUPTA, 2001).

No presente estudo, observou-se uma acentuada resposta inflamatória no cérebro de ratos injetados com STZ-ICV, que é representada pela microgliose e astrogliose reativas, especialmente nas áreas peri-ventriculares, persistindo até os 30 dias após a cirurgia (FIGURAS 8-11). A micróglia reativa estava localizada próxima às paredes dos ventrículos laterais, enquanto os astrócitos se acumularam ao redor da micróglia reativa formando um halo (FIGURAS 9B, 11B). Kraska et al. (KRASKA et al., 2012) relataram previamente uma gliose reativa similar 7 dias após a injeção ICV de STZ e uma marcada

degeneração do septo e corpo caloso, dependente da dose de STZ, três meses depois da cirurgia. A microgliose parece ter se desenvolvido antes da astrogliose no hipocampo, considerando que o número de células GFAP-positivas aumentou somente na área CA3 e somente 30 dias depois da administração de STZ (FIGURA 10C, 11A). Em contraste, a ativação microglial foi observada em todas as áreas do hipocampo e nos dois tempos analisados (FIGURA 8). O padrão de distribuição das células gliais nas áreas periventriculares aos 7 dias após a injeção de STZ-ICV também sugere que a micróglia foi recrutada antes dos astrócitos na resposta inflamatória promovida pela STZ (FIGURAS 9B, 11B). Observou-se também uma reação microglial persistente e mais pronunciada na área CA3 do hipocampo, na qual o número total de células Iba-1-positivas e de células reativas aumentou somente nesta região aos 30 dias depois da injeção ICV de STZ (FIGURAS 8C, 9A).

O aumento dos níveis de TNF- α no córtex pré-frontal (FIGURA 14C) provavelmente reflete uma difusão irregular de citocinas pró-inflamatórias que foram liberadas da micróglia e astrócitos reativos a partir das áreas periventriculares mais afetadas para outras áreas cerebrais. No hipocampo, esperava-se encontrar aumento nos níveis de TNF- α , mas nenhuma diferença significativa foi observada (FIGURA 14D), provavelmente porque a estrutura inteira foi analisada no ensaio de ELISA. Uma vez que o hipocampo ventral foi relativamente preservado da lesão induzida por STZ, os níveis de citocinas podem ser maiores na parte dorsal do hipocampo do que na parte ventral, influenciando dessa forma a quantificação do TNF- α .

A neuroinflamação aguda e crônica pode impactar negativamente várias etapas do processo de neurogênese adulta no cérebro dos animais. A neurogênese está alterada em muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (WANG; JIN, 2015), e a neuroinflamação é uma característica comum delas, que pode ser prejudicial ou benéfica devido ao papel dual da micróglia. A micróglia em repouso tem efeitos pró-neurogênicos devido à fagocitose de parte dos novos neurônios que sofrem apoptose, pois esta ação é benéfica para a homeostase do nicho neurogênico. Em contraste, a micróglia ativada libera muitas citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , e IFN- γ , que podem inibir a proliferação, diferenciação e sobrevivência das CTN/CPN,

resultando em efeitos antineurogênicos (FUSTER-MATANZO et al., 2013; WANG; JIN, 2015). No presente estudo, observaram-se uma resposta inflamatória aguda e uma diminuição acentuada no marcador de proliferação celular Ki-67 na ZSV e no GD aos 7 dias após a injeção ICV de STZ (FIGURAS 12A, B, 13). Isso sugere que a resposta inflamatória aguda desencadeada pela STZ, que é representada pelos astrócitos e micróglia ativada e mediadores inflamatórios liberados por essas células gliais, pode ser responsável pela inibição da proliferação das CTN/CPN em ambos os nichos neurogênicos. Adicionalmente, a redução no número de células duplamente marcadas para BrdU e NeuN no giro denteado dos animais injetados com STZ-ICV aos 30 dias após a cirurgia (FIGURAS 12C, 13) sugere uma diminuição na sobrevivência e diferenciação/maturação de novos neurônios. Os efeitos da STZ e da neuroinflamação induzida pela STZ sobre a proliferação das CTN/CPN, sobrevivência e diferenciação resultou em um número menor de neurônios imaturos no cérebro de animais injetados com STZ-ICV, representado por uma redução nas células DCX-positivas no giro denteado e na DCX-IR na ZSV aos 30 dias após a cirurgia (FIGURAS 12D, E, 13). QU et al. (2012) haviam demonstrado uma redução no número de novos neurônios (células BrdU e Tuj1-positivas) no giro denteado de ratos Sprague-Dawley 21 dias após a injeção de STZ-ICV, o que foi associado com um pronunciado estresse oxidativo. SUN et al. (2015) haviam relatado uma diminuição na geração de neurônios imaturos e maduros no giro denteado de ratos três meses após a administração de STZ-ICV, mas não após um mês, o que foi correlacionado com o desenvolvimento de agregados amiloides. A resposta inflamatória aguda e persistente pode ter sido responsável pelos prejuízos precoces na neurogênese observados no presente trabalho.

Outros fatores que influenciam e regulam a neurogênese adulta são fatores de crescimento e neurotrofinas como o BDNF. Esta molécula parece estimular a plasticidade neuronal e a neurogênese através da ativação do seu receptor TrkB nas CPN, promovendo diferenciação neuronal e sobrevivência. O BDNF é também essencial para a potenciação de longo-prazo, contribuindo para a plasticidade sináptica, aprendizado e memória (TAPIA-ARANCIBIA et al., 2008). Em pacientes com a DA, a expressão de BDNF é bastante reduzida no hipocampo e algumas áreas corticais, como os córtices temporal e frontal

(MURER; YAN; RAISMAN-VOZARI, 2001; TAPIA-ARANCIBIA et al., 2008), apesar de um relato de aumento significativo de BDNF no hipocampo de pacientes com DA (DURANY et al., 2000). Neste estudo, observou-se um aumento nos níveis proteicos de BDNF no córtex pré-frontal (FIGURA 14A) em animais injetados com STZ e nenhuma alteração significativa no hipocampo (FIGURA 14B) em comparação com o grupo sham, no dia 7 após a cirurgia. Estudos prévios que utilizaram o modelo STZ-ICV em ratos relataram uma diminuição nos níveis de BDNF no hipocampo 30 dias após a injeção de STZ acompanhados por prejuízo na potenciação de longo-prazo (SHONESY et al., 2012) e aprendizado espacial (SIM, 2014). As discrepâncias entre os resultados desses estudos prévios e o presente estudo poderiam ser atribuídas à participação da micróglia ativada que libera fatores neurotróficos como o basic fibroblast growth factor (bFGF) e o BDNF (WANG; JIN, 2015). Observou-se uma ativação microglial aguda no dia 7 após a injeção de STZ nas áreas peri-ventriculares e hipocampo, o que poderia ser responsável pela elevação do BDNF no córtex pré-frontal como uma reação compensatória à lesão. À medida que o processo inflamatório diminui com o tempo (diminuição da reatividade glial), os níveis de BDNF também diminuem, como mostrado por estudos prévios, contribuindo para os prejuízos na memória e neurogênese.

A relação entre a neurogênese adulta, especialmente no giro dentado, e o aprendizado e memória dependentes do hipocampo tem sido extensivamente investigados. Muitos estudos relatam uma correlação positiva entre esses dois processos: um aumento na neurogênese hipocampal facilita as funções cognitivas dependentes do hipocampo, como a separação de padrões similares e o aprendizado e a memória espacial. Reciprocamente, uma redução na neurogênese hipocampal está associada com déficits na separação de padrões similares e no aprendizado e na memória espacial (HANSON; OWENS; NEMEROFF, 2011; SAHAY et al., 2011; YAU; LI; SO, 2015). Os nossos resultados são consistentes com esses trabalhos. Os déficits cognitivos nos animais injetados com STZ-ICV, representados pelo prejuízo na memória espacial de curto e longo prazo, foram associados com diminuição da neurogênese hipocampal.

Além do impacto negativo da neuroinflamação sobre a neurogênese e cognição, o bem documentado prejuízo na sinalização cerebral da insulina

induzido pela STZ (CORREIA et al., 2012) pode ter contribuído para os déficits na memória e neurogênese adulta encontrados no presente trabalho. A insulina é uma molécula pleiotrópica. No cérebro, assim como na periferia, é considerada o regulador principal do metabolismo da glicose. A insulina atua como um neurohormônio e neuromodulador e desempenha um papel importante no crescimento e sobrevivência neuronal (CORREIA et al., 2011). Evidências crescentes sugerem que a sinalização cerebral da insulina através dos receptores de insulina é importante para a plasticidade sináptica por modular a atividade de receptores excitatórios e inibitórios (i.e., receptores de glutamato e GABA). Adicionalmente, cascatas de transdução de sinal que são desencadeadas pela ativação de receptores de insulina levam à alterações na expressão de genes necessários para a consolidação da memória a longo prazo (CORREIA et al., 2011).

Em resumo, os resultados desta primeira parte do trabalho indicam que a pronunciada resposta inflamatória desencadeada pela injeção de STZ-ICV, representada por astrogliose e microgliose reativas e aumento nos níveis de $\text{TNF-}\alpha$, ocorreu concomitantemente com a diminuição da neurogênese subventricular e hipocampal. Esses resultados apoiam evidências anteriores de um efeito negativo da neuroinflamação sobre a neurogênese, enquanto ambos os fatores parecem contribuir para os prejuízos cognitivos observados no modelo STZ-ICV da DA esporádica.

A segunda parte deste trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento prolongado com curcumina na memória espacial e de reconhecimento de objetos de curto prazo, na neuroinflamação e na neurogênese adulta no modelo induzido por STZ-ICV da DA esporádica. Realizaram-se também análises comportamentais não cognitivas dos animais no campo aberto e LCE para avaliar a atividade locomotora espontânea e o comportamento tipo ansioso, respectivamente, pois prejuízos motores e ansiedade poderiam reduzir o desempenho dos animais nos testes cognitivos. Nenhuma diferença entre os grupos foi observada no teste de campo aberto (TABELA 3), sugerindo não haver alterações motoras em animais injetados com STZ-ICV e tratados com curcumina em todas as doses. Além disso, os grupos STZ e STZ+cur 100 passaram menos tempo e exibiram menor porcentagem de tempo gasto nos braços fechados do LCE (TABELA 4),

sugerindo uma redução do comportamento tipo ansioso em comparação com o grupo sham. No entanto, nenhum dos grupos analisados mostrou aumento do comportamento tipo ansioso em comparação com o grupo sham em todos os parâmetros avaliados no LCE, de forma similar aos resultados da primeira parte deste trabalho (TABELA 1).

Os animais lesados com STZ-ICV exibiram prejuízos na memória espacial de curto prazo no TLO e labirinto em Y, e prejuízos na memória de reconhecimento de curto prazo no TRO (FIGURA 15). O declínio do aprendizado e memória espacial foi relatado em diversos estudos em animais que receberam STZ-ICV (AGRAWAL et al., 2009, 2010; BIASIBETTI et al., 2013; EJAZ AHMED et al., 2013; JAVED et al., 2012). Além disso, o prejuízo na memória de reconhecimento foi demonstrado em ratos injetados com STZ-ICV (RAVELLI et al., 2017). O tratamento prolongado com curcumina por 30 dias não foi capaz de prevenir o declínio na memória espacial de curto prazo no TLO e no labirinto em Y (FIGURAS 15A, C) em todas as doses testadas (25, 50 e 100 mg/kg). Contudo, no TRO, os grupos STZ+cur 50 e STZ+cur 100 exibiram um aumento no índice de discriminação comparado com o grupo STZ (FIGURA 15B), sugerindo um possível efeito positivo da curcumina na memória de reconhecimento de objetos de curto prazo.

As memórias de reconhecimento e espacial são codificadas em estruturas cerebrais similares, mas não totalmente sobrepostas. Evidências sugerem que as regiões parahipocampais do lobo temporal (i.e., os córtices perirrinal, entorrinal e temporal inferior) são muito importantes para a memória visual de reconhecimento de objetos em roedores e primatas (HAMMOND; TULL; STACKMAN, 2004). O córtex perirrinal é o local de entrada de muitas informações sensoriais como estímulos visuais, olfatórios e somatossensoriais envolvidos no reconhecimento de objetos e, o córtex perirrinal também envia impulsos nervosos para o hipocampo. O córtex perirrinal está envolvido no reconhecimento de objetos após curtos períodos de intervalo (memória de curto prazo), enquanto o hipocampo é responsável pelo reconhecimento de objetos de longa duração. O hipocampo dorsal desempenha um papel importante especialmente quando informações espaciais ou de contexto são um fator relevante (ANTUNES; BIALA, 2012). Lesões hipocampais produzem déficits na aquisição e retenção da memória espacial (RAMOS, 2013). As

diferentes estruturas que codificam a memória espacial e de reconhecimento podem estar envolvidas com as discrepâncias nos efeitos da curcumina nessas diferentes memórias.

Muitos estudos demonstraram efeitos positivos da curcumina em processos cognitivos. A curcumina melhorou o aprendizado e a memória espacial em tarefas cognitivas como o Labirinto Aquático de Morris e a esQUIVA passiva em ratos (DONG et al., 2012) e camundongos idosos (YU et al., 2013), no modelo de DA induzido por infusão ICV do peptídeo A β em ratos (AHMED; ENAM; GILANI, 2010), e no modelo induzido por STZ-ICV da DA em camundongos (AWASTHI et al., 2010) e ratos (AGRAWAL et al., 2010; ISHRAT et al., 2009; ISIK et al., 2009). A curcumina também melhorou a memória de reconhecimento de objetos em camundongos idosos (YU et al., 2013). Mas este é o primeiro relato de melhora na memória de reconhecimento de objetos de curto prazo para a curcumina no modelo STZ-ICV da DA esporádica.

Conforme mencionado anteriormente, muitos estudos relacionam as funções cognitivas dependentes do hipocampo, como o aprendizado e a memória espacial e a separação de padrões similares, com a neurogênese hipocampal (HANSON; OWENS; NEMEROFF, 2011; SAHAY et al., 2011; YAU; LI; SO, 2015). Recentemente, sugeriu-se também um papel para os novos neurônios do hipocampo na aquisição e consolidação da memória de reconhecimento de objetos (JESSBERGER et al., 2009; SUÁREZ-PEREIRA; CANALS; CARRIÓN, 2015). Os resultados do presente trabalho são consistentes com esses estudos anteriores, pois mostram que os déficits cognitivos nos animais injetados com STZ-ICV, representados por prejuízos na memória espacial e de reconhecimento de curto prazo, foram associados com uma redução na neurogênese adulta tanto no GD do hipocampo quanto na ZSV (FIGURAS 16 e 17). Esperava-se que o tratamento prolongado com curcumina melhorasse os prejuízos na neurogênese adulta provocados pela STZ-ICV devido aos relatos prévios dos seus efeitos positivos na neurogênese adulta tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DONG et al., 2012; KIM et al., 2008; LIAO et al., 2012; NAM et al., 2014; TIWARI et al., 2014; XU et al., 2007). Entretanto, o tratamento com curcumina em todas as três doses testadas não restabeleceu a proliferação celular e o número de neurônios imaturos, representados pelas células Ki-67-positivas (FIGURAS 16A, B, 17A) e DCX-positivas (FIGURAS

16C, D, 17B), respectivamente, tanto na ZSV dos ventrículos laterais quanto no GD do hipocampo. Somente a maior dose de curcumina (100 mg/kg) exibiu um ligeiro aumento, porém não significativo, no número de células Ki-67 e DCX-positivas no GD (FIGURA 16B, D).

Os efeitos moderados da curcumina na cognição e neurogênese poderiam ser atribuídos à sua capacidade limitada de inibir o processo inflamatório nos animais lesados com STZ-ICV nas doses e regime de administração testados no presente estudo. Sabe-se que a neuroinflamação aguda e crônica, encontrada em muitas doenças neurodegenerativas como a DA, pode impactar negativamente diversas etapas da neurogênese no cérebro dos animais, prejudicando a proliferação, diferenciação e sobrevivência das CTN/CPN (AIMONE et al., 2014; WANG; JIN, 2015). Neste estudo, observou-se uma forte resposta inflamatória nas áreas peri-ventriculares e no hipocampo dos animais lesados com STZ-ICV, representado por aumento na imunoreatividade para Iba-1 (Iba-1-IR; FIGURAS 18 e 19) e GFAP (GFAP-IR; FIGURAS 20 e 21) aos 30 dias depois da cirurgia. O tratamento com curcumina não diminuiu a GFAP-IR nas áreas periventriculares e no hipocampo (FIGURAS 20 e 21). Além disso, causou uma redução parcial na Iba-1-IR no corpo caloso (FIGURA 18C), mas não nos ventrículos laterais, septo e hipocampo (FIGURA 18A,B, D-F).

O aumento na imunoreatividade para ambos os marcadores gliais ocorreu juntamente com a diminuição dos marcadores de proliferação celular (Ki-67) e neurônios imaturos (DCX) na ZSV e no giro denteado aos 30 dias depois da administração de ICV de STZ (FIGURAS 16 e 17). Isso sugere que a resposta inflamatória desencadeada pela STZ pode estar envolvida na inibição da proliferação das CTN/CPN e da diferenciação em novos neurônios em ambos os nichos neurogênicos, e que os efeitos limitados da curcumina na inibição da ativação das células gliais podem estar relacionados aos seus efeitos igualmente limitados sobre a neurogênese e cognição. Estudos clínicos com curcumina em pacientes com DA também não encontraram resultados satisfatórios na cognição e biomarcadores no sangue e fluido cérebro espinal (HAMAGUCHI; ONO; YAMADA, 2010). Esses resultados contrastam com os de uma revisão sistemática da literatura que encontrou uma correlação positiva entre o uso de cúrcuma e a melhora nos sintomas da DA; contudo, os

benefícios de longo prazo ainda precisam ser estudados nos diversos estágios da doença (SHARMAN et al., 2017). Uma limitação de muitos estudos clínicos e epidemiológicos é o fato de não categorizarem os pacientes de acordo com os estágios da DA, o que dificulta a avaliação da eficácia dos tratamentos testados. Além disso, estudos pré-clínicos demonstram efeitos antiinflamatórios da curcumina em diversos modelos. A curcumina suprimiu a ativação do NF- κ B *in vitro* (SINGH; AGGARWAL, 1995), reduziu a expressão de GFAP no hipocampo de ratos no modelo de DA induzido por peptídeos A β (WANG et al., 2013) e no modelo induzido por ácido ibotênico + peptídeos A β (AHMED; GILANI, 2011), bem como reduziu a imunoreatividade para Iba-1 e GFAP no estriado de camundongos lesados com 6-hidroxidopamina (TRIPANICHKUL; JAROENSUPPAPERCH, 2013). A curcumina também mostrou efeito antidepressivo e neuroprotetor em ratos lesados com 6-hidroxidopamina (GRADOWSKI et al., 2013).

Os resultados do tratamento com curcumina podem ter sido influenciados pela sua baixa biodisponibilidade oral, apesar das doses testadas estarem dentro da faixa de doses que mostraram resultados positivos na literatura. Estudos mostram que a curcumina é pouco absorvida a partir do intestino depois de uma administração oral de diferentes doses de 3 H-curcumina em ratos. Estima-se que aproximadamente 75% de uma dose oral de curcumina seja excretada nas fezes, o que indica uma baixa absorção da curcumina pelo intestino (MAHESHWARI et al., 2006). As discrepâncias entre os resultados do presente estudo e os de estudos prévios podem ser devido à ampla faixa de doses testadas em outros trabalhos (10 - 300 mg/kg), diferentes vias de administração (intraperitoneal, gavagem ou suplementação da ração), diferentes veículos e duração do tratamento (10 dias a 12 semanas). Adicionalmente, a dose de STZ (3 mg/kg) usada no presente estudo é considerada alta devido ao acentuado estresse oxidativo e neuroinflamação desencadeados, os quais seriam comparáveis a um estágio moderado a avançado da DA (KRASKA et al., 2012). O tratamento com curcumina em animais lesados com doses menores de STZ, mimetizando estágios iniciais da DA, provavelmente resultaria em desfechos terapêuticos melhores.

Em resumo, a administração ICV de STZ produziu prejuízos cognitivos na memória espacial e de reconhecimento de curto prazo, redução da neurogênese adulta e neuroinflamação, os quais foram parcialmente melhorados pela curcumina. O tratamento oral prolongado com curcumina nas doses de 50 e 100 mg/kg preservou a memória de reconhecimento de objetos de curto prazo, mas não a memória espacial de curto prazo. Todas as doses de curcumina testadas exerceram apenas uma melhora limitada sobre a neuroinflamação, resultando em ausência de efeitos significativos sobre a neurogênese hipocampal e subventricular. Os resultados sugerem um efeito positivo da curcumina na memória de reconhecimento de objetos de curto prazo que não está relacionado à neurogênese adulta.

7 CONCLUSÃO

Os experimentos de caracterização do modelo animal de DA esporádica induzido por administração ICV bilateral de STZ em ratos Wistar mostraram que a STZ desencadeou uma acentuada resposta inflamatória aguda e tardia, que foi representada por astrogliose e microgliose reativas e aumento nos níveis de TNF- α . A neuroinflamação aguda ocorreu concomitantemente com a redução da proliferação das CTN/CPN na ZSV e na ZSG do GD do hipocampo. Verificou-se também a redução da sobrevivência e diferenciação/maturação dos novos neurônios no GD do hipocampo, resultando em um menor número de neurônios imaturos na ZSV e no GD do hipocampo. A neuroinflamação e a inibição da neurogênese estavam associadas ao prejuízo cognitivo na memória espacial de curto e longo prazo. Esses resultados apoiam evidências anteriores de um efeito negativo da neuroinflamação sobre a neurogênese adulta.

No experimento de tratamento com curcumina, a administração ICV de STZ novamente desencadeou uma gliose reativa acompanhada de redução da neurogênese hipocampal e subventricular, resultando em prejuízos cognitivos nos animais. O tratamento oral prolongado com curcumina nas doses de 50 e 100 mg/kg preservou a memória de reconhecimento de objetos de curto prazo, mas não a memória espacial de curto prazo. Todas as doses de curcumina testadas exerceram uma melhora limitada sobre a neuroinflamação (reatividade glial), o que não foi suficiente para restaurar significativamente a neurogênese

hipocampal e subventricular. Esses resultados sugerem um possível efeito positivo da curcumina na memória de reconhecimento de objetos de curto prazo que não está relacionado à neurogênese. Mais investigações são necessárias para se avaliar os possíveis efeitos benéficos da curcumina na DA, especialmente em modelos da fase inicial desta doença.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, C.; ANDERSON, H. D.; ANDERSON, C. M. Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. **Journal of Neuroscience Research**, 2017.

AGRAWAL, R. et al. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 4, p. 779–787, 2009.

AGRAWAL, R. et al. Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 247–252, 2010.

AHMED, T.; ENAM, S. A.; GILANI, A. H. Curcuminoids enhance memory in an amyloid-infused rat model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 169, n. 3, p. 1296–1306, 2010.

AHMED, T.; GILANI, A. H. A comparative study of curcuminoids to measure their effect on inflammatory and apoptotic gene expression in an Abeta plus ibotenic acid-infused rat model of Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 1400, p. 1–18, 2011.

AIMONE, J. B. et al. Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 991–1026, 2014.

AK, T.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n. 1, p. 27–37, 2008.

ALVAREZ, E. O. et al. Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. **Behavioural Brain Research**, v. 198, n. 1, p. 224–230, 2009.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93–110, 2012.

AULD, D. S. et al. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. **Progress in Neurobiology**, v. 68, p. 209–245, 2002.

AWASTHI, H. et al. Protective effect of curcumin against intracerebral streptozotocin induced impairment in memory and cerebral blood flow. **Life Sciences**, v. 86, n. 3–4, p. 87–94, 2010.

BELKACEMI, A. et al. Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, n. November, p. e34, 2011.

BELVIRANLI, M. et al. Curcumin improves spatial memory and decreases

oxidative damage in aged female rats. **Biogerontology**, v. 14, n. 2, p. 187–196, 2013.

BIASIBETTI, R. et al. Green tea (-)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. **Behavioural Brain Research**, v. 236, n. 1, p. 186–193, 2013.

BONDA, D. J. et al. Neuropharmacology Oxidative stress in Alzheimer disease : A possibility for prevention. **Neuropharmacology**, v. 59, n. 4–5, p. 290–294, 2010.

BRAAK, H. et al. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. **Acta Neuropathologica**, v. 112, n. 4, p. 389–404, 2006.

BRAAK, H. et al. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 70, n. 11, p. 960–9, 2011.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. **Acta Neuropathologica**, v. 82, p. 239–259, 1991.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Alzheimer's disease: Pathogenesis and prevention. **Alzheimer's & Dementia**, v. 8, n. 3, p. 227–233, 2012.

BRAUN, S. M. G.; JESSBERGER, S. Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. **Development**, v. 141, n. 10, p. 1983–1986, 2014.

BRILEY, D. et al. Preserved neurogenesis in non-demented individuals with AD neuropathology. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 27812, 2016.

BUTTERFIELD, D. A.; DI DOMENICO, F.; BARONE, E. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: a key role for oxidative stress in brain. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1842, n. 9, p. 1693–706, 2014.

CAMERON, B.; LANDRETH, G. E. Inflammation, microglia, and alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 3, p. 503–509, 2010.

CAMERON, H. A.; GLOVER, L. R. Adult Neurogenesis: Beyond Learning and Memory. **Annual Review of Psychology**, v. 66, n. 1, p. 53–81, 2015.

CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos em psicofarmacologia comportamental**: um guia para o estudo de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas planas medicinais. São Paulo: Fap-Unifesp, 2011.

CHEN, Y. et al. A Non-transgenic Mouse Model (icv-STZ Mouse) of Alzheimer's Disease: Similarities to and Differences from the Transgenic Model (3xTg-AD Mouse). **Molecular Neurobiology**, p. 1–15, 2012.

CLARK, I. et al. Tumor Necrosis Factor-Induced Cerebral Insulin Resistance in Alzheimer's Disease Links Numerous Treatment Rationales. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 4, p. 1004–1026, 2012.

CORREIA, S. C. et al. Insulin-resistant brain state: The culprit in sporadic Alzheimer's disease? **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 2, p. 264–273, 2011.

CORREIA, S. C. et al. Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: Major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. **Brain Research**, v. 1441, p. 64–78, 2012.

CUMMINGS, J. et al. Role of Donepezil in the Management of Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 22, n. 3, p. 159–66, 2016.

DE BRUIN, N. M. W. J. et al. Two novel 5-HT₆ receptor antagonists ameliorate scopolamine-induced memory deficits in the object recognition and object location tasks in Wistar rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, n. 2, p. 392–402, 2011.

DE STROOPER, B.; KARRAN, E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 603–615, 2016.

DERE, E.; PAUSE, B. M.; PIETROWSKY, R. Emotion and episodic memory in neuropsychiatric disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 215, n. 2, p. 162–171, 2010.

DONG, S. et al. Curcumin enhances neurogenesis and cognition in aged rats: Implications for transcriptional interactions related to growth and synaptic plasticity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–12, 2012.

DURANY, N. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 Levels in Alzheimer's Disease Brains. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 807–813, 2000.

EJAZ AHMED, M. et al. Amelioration of cognitive impairment and neurodegeneration by catechin hydrate in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 4, p. 492–501, 2013.

EKONOMOU, A. et al. Stage-specific changes in neurogenic and glial markers in Alzheimer's disease. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 8, p. 711–719, 2015.

ERNST, A. et al. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. **Cell**, v. 156, n. 5, p. 1072–1083, 2014.

FATTORI, V. et al. Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by increasing Nrf2 expression and reducing NF- κ B activation. **Inflammation Research**, v. 64, n. 12, p. 993–1003, 2015.

FAURE, A. et al. Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 32, n. 3, p. 407–418, 2011.

FUSTER-MATANZO, A. et al. Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. **Mediators of inflammation**, v. 2013, p. 260925, 2013.

GAO, Z. et al. Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. **Molecular Neurobiology**, v. 48, n. 3, p. 690–701, 2013.

GARTHE, A.; BEHR, J.; KEMPERMANN, G. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, 2009.

GOMES, F. V. et al. Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. **Schizophrenia Research**, v. 164, n. 1–3, p. 155–163, 2015.

GONZÁLEZ-REYES, S. et al. Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.

GRADOWSKI, R. W. et al. Antidepressant-like effect of curcumin in 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Current Trends in Neurology**, v. 7, p. 69–80, 2013.

GRAY, J. M. et al. Corticotropin-releasing hormone drives anandamide hydrolysis in the amygdala to promote anxiety. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 9, p. 3879–3892, 2015.

GRÜNBLATT, E. et al. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, n. 3, p. 757–770, 2007.

HAMAGUCHI, T.; ONO, K.; YAMADA, M. Curcumin and Alzheimer's disease. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 16, n. 5, p. 285–297, 2010.

HAMMOND, R. S.; TULL, L. E.; STACKMAN, R. W. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 82, n. 1, p. 26–34, 2004.

HANSON, N. D.; OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. Depression, Antidepressants, and Neurogenesis: A Critical Reappraisal. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 13, p. 2589–2602, 2011.

HATCHER, H. et al. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials.

Cellular and Molecular Life Sciences, v. 65, n. 11, p. 1631–1652, 2008.

HAUGHEY, N. J. et al. Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease.

Neuromolecular Med, v. 1, n. 2, p. 125–135, 2002a.

HAUGHEY, N. J. et al. Disruption of neurogenesis by amyloid b -peptide , and perturbed neural progenitor cell homeostasis , in models of Alzheimer ' s disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, p. 1509–1524, 2002b.

HOKAMA, M. et al. Altered expression of diabetes-related genes in Alzheimer's disease brains: The Hisayama study. **Cerebral Cortex**, v. 24, n. 9, 2014.

HOSSEINZADEH, S. et al. Elevated CSF and plasma microparticles in a rat model of streptozotocin-induced cognitive impairment. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 503–511, 2013.

HOYER, S. et al. Brain glucose metabolism is controlled by amplification and desensitization of the neuronal insulin receptor. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 777, p. 374–379, 1996.

HUANG, Z. et al. Neuroscience Letters Curcumin reverses corticosterone-induced depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels in rats. **Neuroscience Letters**, v. 493, n. 3, p. 145–148, 2011.

HURLEY, L. L. et al. Antidepressant-like effects of curcumin in WKY rat model of depression is associated with an increase in hippocampal BDNF. **Behavioural Brain Research**, v. 239, p. 27–30, 2013.

ISHRAT, T. et al. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 9, p. 636–647, 2009.

ISIK, A. T. et al. Curcumin ameliorates impaired insulin/IGF signalling and memory deficit in a streptozotocin-treated rat model. **Age**, v. 31, n. 1, p. 39–49, 2009.

JAVED, H. et al. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. **Neuroscience**, v. 210, p. 340–352, 2012.

JESSBERGER, S. et al. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. **Learning & Memory**, v. 16, n. 2, p. 147–154, 2009.

JIN, K. et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer ' s disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 1, p. 343–347, 2003.

JIN, K. et al. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw,Ind}) mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 36, p. 13363–13367, 2004.

KANG, S.-K.; CHA, S.-H.; JEON, H.-G. Curcumin-induced Histone Hypoacetylation Enhances Caspase-3-dependent Glioma Cell Death and Neurogenesis of Neural Progenitor Cells. **Stem Cells and Development**, v. 15, n. 2, p. 165–174, 2006.

KAWABORI, M.; YENARI, M. A. The role of the microglia in acute CNS injury. **Metabolic Brain Disease**, p. 381–392, 2014.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 493–495, 1997.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiological reviews**, v. 91, n. 2, p. 461–553, 2011.

KIM, S. J. et al. Curcumin Stimulates Proliferation of Embryonic Neural Progenitor Cells and Neurogenesis in the Adult Hippocampus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 21, p. 14497–14505, 2008.

KNEZOVIC, A. et al. Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 122, n. 4, p. 577–592, 2015.

KRASKA, A. et al. In Vivo Cross-sectional Characterization of Cerebral Alterations Induced by Intracerebroventricular Administration of Streptozotocin. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–9, 2012.

KUMAR, A.; SINGH, A.; EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p. 195–203, 2015.

KWON, N. S. et al. Nitric oxide generation from streptozotocin. **FASEB journal**, v. 8, n. 8, p. 529–533, 1994.

LANNERT, H. et al. Effects of Estradiol (-17 β) on learning, memory and cerebral energy metabolism in male rats after intracerebroventricular administration of streptozotocin. **Journal of neural transmission**, v. 105, n. 8–9, p. 1045–63, 1998.

LANNERT, H.; HOYER, S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, n. 5, p. 1199–1208, 1998.

LIAO, K. K. et al. Curcuminoids promote neurite outgrowth in PC12 cells through MAPK/ERK- and PKC-dependent pathways. **Journal of Agricultural**

and Food Chemistry, v. 60, n. 1, p. 433–443, 2012.

MAHESHWARI, R. K. et al. Multiple biological activities of curcumin: A short review. **Life Sciences**, v. 78, n. 18, p. 2081–2087, 2006.

MANGIALASCHE, F. et al. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 7, p. 702–716, 2010.

MATTHEWS, B. R. Memory Dysfunction. **Continuum (Minneapolis)**, v. 21, n. 3, p. 613–626, 2015.

MAURER, K.; VOLK, S.; GERBALDO, H. Auguste D and Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1546–1549, 1997.

MAYER, G.; NITSCH, R.; HOYER, S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. **Brain Research**, v. 532, n. 1–2, p. 95–100, 1990.

MELLO-CARPES, P. B.; IZQUIERDO, I. The nucleus of the solitary tract→nucleus paraventricularis→locus coeruleus→CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 100, p. 56–63, 2013.

MICHAUD, M. et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. **Journal of the American Medical Association**, v. 14, n. 12, p. 877–882, 2013.

MING, G.; SONG, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 223–250, 2005.

MONROY, A.; LITHGOW, G. J.; ALAVEZ, S. Curcumin and neurodegenerative diseases. **BioFactors**, v. 39, n. 1, p. 122–132, 2013.

MURER, M. G.; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 63, n. 1, p. 71–124, 2001.

NAM, S. M. et al. Effects of Curcumin (Curcuma longa) on Learning and Spatial Memory as Well as Cell Proliferation and Neuroblast Differentiation in Adult and Aged Mice by Upregulating Brain-Derived Neurotrophic Factor and CREB Signaling. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 6, p. 641–649, 2014.

NITSCH, R.; HOYER, S. Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. **Neuroscience Letters**, v. 128, n. 2, p. 199–202, 1991.

OSMANOVIC BARILAR, J. et al. Nine-month follow-up of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 122, n. 4, p. 565–576, 2015.

PARK, S. J. et al. Quantitative expression analysis of APP pathway and tau phosphorylation-related genes in the ICV STZ-induced non-human primate model of sporadic alzheimer's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, 2015.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 5th edition. Ed. San Diego: Academic Press, 1997.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PERRY, E. K. et al. Neurogenic abnormalities in Alzheimer's disease differ between stages of neurogenesis and are partly related to cholinergic pathology. **Neurobiology of Disease**, v. 47, n. 2, p. 155–162, 2012.

PRICKAERTS, J.; FAHRIG, T.; BLOKLAND, A. Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: A correlation analysis. **Behavioural Brain Research**, v. 102, n. 1–2, p. 73–88, 1999.

QU, Z. QIANG et al. Protective effects of a rhodiola crenulata extract and salidroside on hippocampal neurogenesis against streptozotocin-induced neural injury in the rat. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

RAJASEKAR, N. et al. Intranasal Insulin Administration Ameliorates Streptozotocin (ICV)-Induced Insulin Receptor Dysfunction, Neuroinflammation, Amyloidogenesis, and Memory Impairment in Rats. **Molecular Neurobiology**, 2016.

RAMOS, J. M. J. Differential contribution of hippocampus, perirhinal cortex and postrhinal cortex to allocentric spatial memory in the radial maze. **Behavioural Brain Research**, v. 247, p. 59–64, 2013.

RAVELLI, K. G. et al. Intracerebroventricular Streptozotocin as a Model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and Behavioral Characterization in Mice. **Neurotoxicity Research**, v. 31, n. 3, p. 327–333, 2017.

RODRÍGUEZ, J. J. et al. Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's Disease. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, 2008.

ROSENBERG, P. B.; NOWRANGI, M. A.; LYKETSOS, C. G. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: What might be associated brain circuits? **Molecular Aspects of Medicine**, v. 43–44, p. 25–37, 2015.

SAHAY, A. et al. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 466–470, 2011.

SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, n. 4, p. 1005–1015, 2006.

SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: A long-term follow up study. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, n. 5, p. 765–772, 2011.

SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. **Journal of Neural Transmission**, v. 120, n. 1, p. 233–252, 2013.

SANTOS, T. DE O. et al. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. **Physiology and Behavior**, v. 107, n. 3, p. 401–413, 2012.

SCHELTS, P. et al. Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 388, n. 10043, p. 505–517, 2016.

SELFRIDGE, J. E. et al. Role of mitochondrial homeostasis and dynamics in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 51, p. 3–12, 2013.

SERRANO-POZO, A. et al. A phenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimer disease. **American Journal of Pathology**, v. 182, n. 6, p. 2332–2344, 2013.

SERY, O. et al. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. **Folia Neuropathologica**, v. 51, n. 1, p. 1–9, 2013.

SHARMA, M.; GUPTA, Y. K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. **Life Sciences**, v. 68, n. 9, p. 1021–1029, 2001.

SHARMAN, J. et al. The Efficacy of Curcumin on Cognition, Depression, and Agitation in Older Adults with Alzheimer's Disease. **The Open Nutrition Journal**, v. 11, n. 1, p. 11–16, 2017.

SHISHODIA, S. Molecular mechanisms of curcumin action: Gene expression. **BioFactors**, v. 39, n. 1, p. 37–55, 2013.

SHONESY, B. C. et al. Central insulin resistance and synaptic dysfunction in intracerebroventricular-streptozotocin injected rodents. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 2, p. 430.e5-430.e18, 2012.

SHORS, T. J. et al. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. **Nature**, v. 410, n. 6826, p. 372–376, 2001.

SIERKSMA, A. S. R. et al. Behavioral and neurobiological effects of prenatal stress exposure in male and female APPswe/PS1dE9 mice. **Neurobiology of Aging**, v. 34, n. 1, p. 319–337, 2013.

SIM, Y.-J. Treadmill exercise alleviates impairment of spatial learning ability through enhancing cell proliferation in the streptozotocin-induced Alzheimer's disease rats. **Journal of exercise rehabilitation**, v. 10, n. 2, p. 81–8, 2014.

SIMPSON, J. E. et al. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. **Neurobiology of Aging**, v. 31, n. 4, p. 578–590, 2010.

SINGH, S; AGGARWAL, B. Activation of Transcription Factor NF-kB Is Suppressed by Curcumin (Diferulolylmethane)*. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 270, n. 42, p. 24995–25000, 1995.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7–35, 2010.

SUÁREZ-PEREIRA, I.; CANALS, S.; CARRIÓN, Á. M. Adult newborn neurons are involved in learning acquisition and long-term memory formation: The distinct demands on temporal neurogenesis of different cognitive tasks. **Hippocampus**, v. 25, n. 1, p. 51–61, 2015.

SUN, P. et al. Long-Term Effects of Intracerebroventricular Streptozotocin Treatment on Adult Neurogenesis in the Rat Hippocampus. **Current Alzheimer Research**, v. 12, n. 8, p. 772–784, 2015.

TAKASU, N. et al. Streptozotocin-and Alloxan-Induced H₂O₂ Generation and DNA Fragmentation in Pancreatic Islets H₂O₂ as Mediator for DNA Fragmentation. **Diabetes**, v. 40, n. March, p. 1141–45, 1991.

TAPIA-ARANCIBIA, L. et al. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. **Brain Research Reviews**, v. 59, n. 1, p. 201–220, 2008.

TAUPIN, P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. **Brain Research Reviews**, v. 53, n. 1, p. 198–214, 2007.

TIWARI, S. K. et al. Curcumin-loaded nanoparticles potently induce adult neurogenesis and reverse cognitive deficits in Alzheimer's disease model via canonical Wnt/ β -catenin pathway. **ACS Nano**, v. 8, n. 1, p. 76–103, 2014.

TONG, C. K.; ALVAREZ-BUYLLA, A. SnapShot: Adult Neurogenesis in the V-SVZ. **Neuron**, v. 81, n. 1, p. 220–220.e1, 2014.

TRIPANICHKUL, W.; JAROENSUPPAPERCH, E. O. Ameliorating effects of curcumin on 6-OHDA-induced dopaminergic denervation, glial response, and SOD1 reduction in the striatum of hemiparkinsonian mice. **European Review**

for **Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1360–1368, 2013.

TU, S. et al. Lost in spatial translation - A novel tool to objectively assess spatial disorientation in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. **Cortex**, v. 67, p. 83–94, 2015.

VADODARIA, K. C.; GAGE, F. H. SnapShot: Adult hippocampal neurogenesis. **Cell**, v. 156, n. 5, p. 1114–1114.e1, 2014.

VANA, L. et al. Progression of tau pathology in cholinergic basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **The American journal of pathology**, v. 179, n. 5, p. 2533–50, 2011.

VAN PRAAG, H. et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13427–31, 1999.

VON BOHLEN UND HALBACH, O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. **Cell and Tissue Research**, v. 345, n. 1, p. 1–19, 2011.

WALDAU, B.; SHETTY, A. K. Behavior of neural stem cells in the Alzheimer brain. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 15, p. 2372–2384, 2008.

WANG, B.; JIN, K. Current perspectives on the link between neuroinflammation and neurogenesis. **Metabolic brain disease**, v. 30, n. 2, p. 355–365, 2015.

WANG, H. M. et al. PPAR γ agonist curcumin reduces the amyloid- β -stimulated inflammatory responses in primary astrocytes. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. 4, p. 1189–1199, 2010.

WANG, R. et al. Curcumin protects against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons by increasing brain-derived neurotrophic factor level and activating TrkB. **Brain Research**, v. 1210, p. 84–91, 2008.

WANG, Y. et al. Curcumin as a Potential Treatment for Alzheimer's Disease: A Study of the Effects of Curcumin on Hippocampal Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 41, n. 1, p. 59–70, 2013.

WEINSTOCK, M.; SHOHAM, S. Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity. **Journal of Neural Transmission**, v. 111, n. 3, p. 347–366, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Draft WHO global action plan on the public health response to dementia 2017-2025**, 2017.

XU, Y. et al. Curcumin reverses the effects of chronic stress on behavior, the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB. **Brain Research**, v.

1122, n. 1, p. 56–64, 2006.

XU, Y. et al. Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats. **Brain Research**, v. 1162, n. 1, p. 9–18, 2007.

YAU, S. Y.; LI, A.; SO, K. F. Involvement of Adult Hippocampal Neurogenesis in Learning and Forgetting. **Neural Plasticity**, v. 2015, 2015.

YEO, H. G. et al. Characterization of Cerebral Damage in a Monkey Model of Alzheimer's Disease Induced by Intracerebroventricular Injection of Streptozotocin. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 46, n. 4, p. 989–1005, 2015.

YU, S. Y. et al. Curcumin ameliorates memory deficits via neuronal nitric oxide synthase in aged mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 47–53, 2013.

ZHANG, L. et al. Curcumin produces antidepressant effects via activating MAPK/ERK-dependent brain-derived neurotrophic factor expression in the amygdala of mice. **Behavioural Brain Research**, v. 235, n. 1, p. 67–72, 2012.

ZUSSY, C. et al. Alzheimer's Disease Related Markers, Cellular Toxicity and Behavioral Deficits Induced Six Weeks after Oligomeric Amyloid- β Peptide Injection in Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.



Decrease in Adult Neurogenesis and Neuroinflammation Are Involved in Spatial Memory Impairment in the Streptozotocin-Induced Model of Sporadic Alzheimer's Disease in Rats

Taysa Bervian Bassani¹ · Jéssica M. Bonato² · Meira M. F. Machado¹ ·
Valentín Cópola-Segovia³ · Eric L. R. Moura¹ · Silvio M. Zanata³ ·
Rúbia M. M. W. Oliveira² · Maria A. B. F. Vital¹

Received: 8 January 2017 / Accepted: 7 June 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract Early impairments in cerebral glucose metabolism and insulin signaling pathways may participate in the pathogenesis of the sporadic form of Alzheimer's disease (sAD). Intracerebroventricular (ICV) injections of low doses of streptozotocin (STZ) are used to mimic sAD and study these alterations in rodents. Streptozotocin causes impairments in insulin signaling and has been reported to trigger several alterations in the brain, such as oxidative stress, neuroinflammation, and dysfunctions in adult neurogenesis, which may be involved in cognitive decline and are features of human AD. The aim of the present study was to assess the influence of neuroinflammation on the process of adult neurogenesis and consequent cognitive deficits in the STZ-ICV model of sAD in Wistar rats. Streptozotocin caused an acute and persistent neuroinflammatory response, reflected by reactive microgliosis and astrogliosis in periventricular areas and the dorsal hippocampus, accompanied by a marked reduction of the proliferation of neural stem cells in the dentate gyrus of the hippocampus and subventricular zone. Streptozotocin also reduced the survival, differentiation, and maturation of newborn neurons, resulting in impairments in short-term and long-term spatial memory. These results support the hypothesis that

neuroinflammation has a detrimental effect on neurogenesis, and both neuroinflammation and impairments in neurogenesis contribute to cognitive deficits in the STZ-ICV model of sAD.

Keywords Alzheimer's disease · Neurogenesis · Neuroinflammation · Streptozotocin · Spatial memory

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia among the elderly. It is a neurodegenerative disorder that is characterized by a progressive decline of cognitive function, memory loss, changes in personality, and an inability of self-care [1, 2]. These cognitive deficits correlate with neuronal and synaptic loss and the formation of neurofibrillary tangles, particularly in cholinergic neurons in the cerebral cortex and hippocampus [1]. Two types of AD are clinically indistinguishable. Familial AD (i.e., early-onset AD) has a genetic origin. Sporadic AD (sAD; i.e., late-onset AD) is the more common form, with an unknown etiology [2, 3]. Early abnormalities in brain glucose and insulin metabolism have been suggested to be etiological events in the pathogenesis of sAD. Patients with sAD have been shown to have lower levels of insulin in cerebrospinal fluid, higher levels of insulin in plasma, lower insulin receptor density, and lower tyrosine kinase activity in the brain, suggesting that abnormalities in brain insulin function and insulin signal transduction are major factors that may trigger the onset of sAD [2].

Supporting the hypothesis that sAD is a brain type of diabetes mellitus, characterized by an insulin-resistant state in post-mortem AD brain tissue samples, a new non-transgenic rat model was proposed to recapitulate human sAD [4]. This

✉ Taysa Bervian Bassani
taysa_bassani@yahoo.com.br

¹ Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR 81540-990, Brazil

² Department of Pharmacology and Therapeutics, State University of Maringá, Maringá, PR 87020-900, Brazil

³ Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR 81531-990, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Effects of curcumin on short-term spatial and recognition memory, adult neurogenesis and neuroinflammation in a streptozotocin-induced rat model of dementia of Alzheimer's type

Taysa B. Bassani^{a,*}, Joelle M. Turnes^a, Eric L.R. Moura^a, Jéssica M. Bonato^b, Valentín Cópola-Segovia^c, Silvio M. Zanata^c, Rúbia M.M.W. Oliveira^b, Maria A.B.F. Vital^a^a Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, 81531-980, Brazil^b Department of Pharmacology and Therapeutics, State University of Maringá, Maringá, PR, 87020-900, Brazil^c Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, 81531-990, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Alzheimer's disease
Curcumin
Adult neurogenesis
Recognition memory
Spatial memory
Neuroinflammation

ABSTRACT

Curcumin is a natural polyphenol with evidence of antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties. Recent evidence also suggests that curcumin increases cognitive performance in animal models of dementia, and this effect would be related to its capacity to enhance adult neurogenesis. The aim of this study was to test the hypothesis that curcumin treatment would be able to preserve cognition by increasing neurogenesis and decreasing neuroinflammation in the model of dementia of Alzheimer's type induced by an intracerebroventricular injection of streptozotocin (ICV-STZ) in Wistar rats. The animals were injected with ICV-STZ or vehicle and curcumin treatments (25, 50 and 100 mg/kg, gavage) were performed for 30 days. Four weeks after surgery, STZ-lesioned animals exhibited impairments in short-term spatial memory (Object Location Test (OLT) and Y maze) and short-term recognition memory (Object Recognition Test – ORT), decreased cell proliferation and immature neurons (Ki-67- and doublecortin-positive cells, respectively) in the subventricular zone (SVZ) and dentate gyrus (DG) of hippocampus, and increased immunoreactivity for the glial markers GFAP and Iba-1 (neuroinflammation). Curcumin treatment in the doses of 50 and 100 mg/kg prevented the deficits in recognition memory in the ORT, but not in spatial memory in the OLT and Y maze. Curcumin treatment exerted only slight improvements in neuroinflammation, resulting in no improvements in hippocampal and subventricular neurogenesis. These results suggest a positive effect of curcumin in object recognition memory which was not related to hippocampal neurogenesis.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common progressive neurodegenerative disorder of the elderly, characterized by a decline in cognitive functions. Sporadic AD (sAD; *i.e.*, late-onset AD), the most frequent form of AD with an unknown etiology, presents early abnormalities in brain glucose metabolism and insulin signaling, thus resulting in an insulin-resistant state in the brain, which has been suggested to be related to etiological events in its pathogenesis [1,2]. Additionally, protein aggregates [3], mitochondrial dysfunctions [4], oxidative stress [5], neuroinflammation [6], brain cholinergic deficits [7], and dysfunctions in adult neurogenesis [8–10] are among the main

features of sAD. These features may be modeled by a intracerebroventricular (ICV) injection of low, subdiabetogenic doses of streptozotocin (STZ) in rodents [11,12] and non-human primates [13].

Adult neurogenesis is a multi-step process of the formation of new neurons in the mammalian brain throughout life. Evidence suggests that newly generated neurons play a crucial role in hippocampus-dependent learning and memory (*e.g.*, spatial memory and orientation) and recovery from neuronal injury [14]. Neurogenesis starts from the proliferation of resident neural stem cells (NSC) and neural progenitor cells (NPC) in two neurogenic niches in the central nervous system (CNS): the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles (LVs), and the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (DG) of the

Abbreviations: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CC, corpus callosum; CNS, central nervous system; DCX, doublecortin; DG, dentate gyrus; EPM, elevated plus maze; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba-1, ionized calcium binding adaptor molecule 1; ICV, intracerebroventricular; LVs, lateral ventricles; NSC, neural stem cells; NPC, neural progenitor cells; OFT, open field test; OLT, object location test; ORT, object recognition test; sAD, sporadic Alzheimer's disease; SGZ, subgranular zone; STZ, streptozotocin; SVZ, subventricular zone; TNF- α , tumor necrosis factor alpha

* Corresponding author.

E-mail address: taysa_bassani@yahoo.com.br (T.B. Bassani).<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.014>

Received 11 July 2017; Received in revised form 1 August 2017; Accepted 5 August 2017

Available online 08 August 2017

0166-4328/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.